

Die Kältebehandlung des Blasenkrebses

1968

von

Karl Michael Schrott

aus

Gschwandt/Oberpfalz

1968 ~~12~~ 14



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546207_0044

Chirurgische Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
(Prof. Dr. G. Hegemann), Urolog. Abt. (Prof. Dr. A. Sigel)

Die Kältebehandlung des Blasenkrebses

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der **Friedrich-Alexander-Universität**
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Karl Michael Schrott

aus

Gschwandt/Oberpfalz

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Professor Dr. A. Kröncke

Referent: Professor Dr. A. Sigel

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 12. 1968

INHALTSVERZEICHNIS:

Theoretischer Teil

Einteilung der Kältebehandlung nach Geschwindigkeit
der Abkühlung und Temperaturtiefe

I. Hypothermie	S. 3
1) Allgemeine Reduzierung der Körpertemperatur oder Hibernation	S. 5
2) Lokale Kühlbehandlung	S. 9
II. Gefriermethoden	
1) Heterogene Nucleation	S.14
2) Homogene Nucleation	S.25
Eigene Theorie zur Selektivität der Cryochirurgie	S.35

Eigene Versuche

Apparatur der Cryochirurgie	S.40
Die Reaktion der gesunden Harnblase auf extreme Kälteläsion (und experimentelle Untersuchungen mit flüssigem Stickstoff)	S.51
Cryotherapie des heterotransplantierten menschlichen Krebses	S.85
Literaturverzeichnis	S.97

GLIEDERUNG DER KÄLTEBEHANDLUNG

I. HYPOTHERMIE

(Kühlmethoden bei erniedrigter Gewebstemperatur bis zum Gefrierpunkt)

- 1) ALLGEMEINE REDUZIERUNG DER KÖRPERTEMPERATUR ODER HIBERNATION
- 2) LOKALE KÜHLBEHANDLUNG

II. GEFRIERMETHODEN

Es gibt drei Methoden, nach denen Wasser vom flüssigen in den festen Aggregatzustand übergeht:

1) HETEROGENE NUCLEATION

Die Eiskristallbildung erfolgt nur extrazellulär!

Sie tritt bei langsamer Abkühlung auf nicht sehr tiefe Temperaturen auf. Die Grenze hängt von der unterschiedlichen Neigung der Zellarten zur Unterkühlung ab. Die heterogene Nucleation kommt normalerweise unter natürlichen Verhältnissen vor.

2) HOMOGENE NUCLEATION

Sie ereignet sich bei rascher Abkühlung auf tiefe Temperaturen. Eiskristalle bilden sich kleiner und zahlreicher extra- und intrazellulär aus.

(Es gelingt nicht, eine einheitliche Grenze zwischen homogener und heterogener Nucleation zu ziehen, da sie bei verschiedenen Zell- und Gewebsarten unterschiedliche Werte für die Geschwindigkeit und die Tiefe des Temperaturabfalls besitzen.)

3) VITRIFICATION

Man versteht darunter die Transformation einer Flüssigkeit in eine amorphe, glasartige Masse ohne Kristallgefüge durch überschnelles Abkühlen von wenigstens -100°C pro Sekunde. Um diese "ideale" Erstarrung zu erreichen,

darf Wasser nicht die geringsten Beimengungen kleinster Ionen enthalten. Es muß sich im chemisch reinsten Zustand befinden. Da ein physiologisches Zellmilieu elektrolythaltig ist, kommt die Vitrification im biologischen Bereich nicht vor.

Die folgende theoretische Abhandlung über die Klassifizierung der Kältebehandlung soll einen Überblick der Kühl- und Gefrierverfahren geben. Sie versucht, grundlegende biologische Vorgänge, die noch in der Mehrzahl einen hypothetischen Charakter besitzen, zu schildern als auch die physiologischen und pathohistologischen Veränderungen zu beschreiben. Soweit es nötig erscheint, werden historische Theorien und Versuchsbeschreibungen zitiert, um der Anschaulichkeit zu dienen und das Thema "DIE KÄLTEBEHANDLUNG DES BLASENKREBSSES" zu konkretisieren.

EINTEILUNG DER KÄLTEBEHANDLUNG NACH GESCHWINDIGKEIT DER ABKÜHLUNG UND TEMPERATURTIEFE

I) HYPOTHERMIE

(Kühlmethoden bei erniedrigter Gewebetemperatur bis zum Gefrierpunkt)

Bei Abkühlung eines Warmblüters fallen in bestimmten Temperaturbereichen wichtige Stoffwechselfunktionen aus, die sonst in einem notwendigen Gleichgewicht gegenseitiger Abhängigkeit stehen:

Unter 30°C verflacht zunehmend die Atmung und endet langsam bei Temperaturen um 25°C .

Bei 15°C tritt Herzstillstand ein.

Die enzymatische Aktivität hält noch bei Temperaturen an, die weit unter 0°C liegen.

Karow und Webb (1) führen hierzu als Beispiel an, daß rote Blutkörperchen selbst bei -80°C in einem Monat signifikant zerfallen.

Die Folgen einer fortgesetzten Enzymaktivität bei aufgehobener Atmung und Stillstand des Stoffwechseltransportes sind Autolyse und Eigenintoxikation.

Ein homoiothermer Organismus widersetzt sich der Unterkühlung durch physikalische und vor allem durch chemische Wärmeregulation.

Die Wärmeabgabe nach der physikalischen Wärmeregulation erfolgt:

- a) durch Leitung,
- b) durch Strahlung,
- c) durch Verdunstung.

a) Wärmeleitung

Die transportierte Wärmemenge ist abhängig von der Temperaturdifferenz zwischen Körperkern und Oberfläche (= Schale) und dem Wärmewiderstand der Körperschale. Dieser ist umgekehrt proportional zur Wärmedurchgangs- oder Wärmeleitzahl.

Die Wärmeleitzahl sinkt bei niedriger Außentemperatur, da durch Kälterezeptoren die Gefäße der Körperschale reflektiv enggestellt werden und die Durchblutung gedrosselt wird.

Abgesehen von den störenden Größen der Blutzirkulation, der Konvektion und dem erheblichen Flüssigkeitsanteil eines Gewebes gilt allgemein für die Wärmeleitung fester Körper:

$$\frac{\Delta Q}{F \cdot \Delta t} = -\lambda \frac{\Delta T}{\Delta x} ; \quad \lambda = \text{Koeffizient der Wärmeleitfähigkeit}$$

Die pro Flächen- und Zeiteinheit abgegebene Wärmemenge ist dem Temperaturunterschied pro Entfernungseinheit proportional.

b) Wärmestrahlung

Nach dem Gesetz von Stefan-Boltzmann hängt die abgestrahlte Energie von der Differenz der vierten Potenz des strahlenden und des absorbierenden Körpers und der Fläche ab.

$$E = k \cdot \epsilon \cdot (T_s^4 - T_a^4) \cdot F$$

$k = \text{Stefan-Boltzmann-Konstante}$
 $\epsilon = \text{Absorptionskonstante}$

c) Verdunstung

Die durch die Haut erfolgende Wasserdiffusion der Perspiratio insensibilis und die aktive Schweißdrüsensekretion der Perspiratio sensibilis hat keine Bedeutung bei Unterkühlung.

Die chemische Wärmeregulation verhindert die Abkühlung des Körpers durch erhöhten Grundumsatz und Kältezittern der Muskulatur.

1) ALLGEMEINE REDUZIERUNG DER KÖRPERTEMPERATUR ODER
HIBERNATION

1938 studierten Temple Fay und G.C. Henny (2) die Körpertemperatur nach einem neurologischen, dermatomären Plan und deren Beziehung zur Lokalisation von Metastasen.

Sie fanden, daß in Körperregionen mit niedrigeren Temperaturen, wie z.B. die Extremitäten, Metastasen selten auftreten und nur geringe Malignität zeigen.

Lawrence W. Smith (3) äußerte die Vermutung, daß Gewebeunterkühlung zu regressiven Veränderungen maligner Zellen führt.

Um die Metastasierung maligner Tumorzellen und das weitere schrankenlose Tumorwachstum zu bremsen oder gar zu verhindern, führen im Jahre 1939 Smith und Fay (4) die allgemeine Kältebehandlung ein.

Praktische Durchführung

Mit Hilfe von Eispackungen, Durchströmungsröhren für Kühlwasser oder besonders konstruierten Kühlbetten wurde die Körperkerntemperatur unter den kritischen Wert von $+95^{\circ}\text{F}$ ($+34,5^{\circ}\text{C}$) abgesenkt und in der Regel ein Arbeitsbereich von 85 bis 88°F (um $+29^{\circ}\text{C}$) aufgesucht.

Da ähnlich wie bei Fiebertherapien die Patienten an Austrocknung litten, wurde der Flüssigkeitsbedarf mit physiologischer Kochsalzlösung und einem Dextrose-Zusatz von 10% ausgeglichen.

Um die Gegenregulation der chemischen Wärmeproduktion auszuschalten, die sich in isometrischer Muskelanspannung, Kältezittern und Unruhe äußert, wurden die Patienten durch intravenöse Gaben von Nembutal leicht narkotisiert.

Smith und Fay (4) bezeichneten die Phase der extrem ruhigen Hibernation als physiologisches Stadium. Sie ist charakterisiert durch:

Minimale Atembewegungen.

Der periphere Puls ist kaum bewertbar.

Geringste Mengen an Eis und Sedativum sind zur Temperatureinstellung auf 85°F nötig.

Es besteht keine Ähnlichkeit mit Tiefschlaf, Narkose oder Coma. Die Patienten bleiben bei Bewußtsein.

Diese Methode wurde von L.W. Smith, T. Fay, Mc Cravey (5), A.J. Jones, J. Graham, A. Mueller (6) und M.K. Newman (7) in den Jahren 1939 bis 1941 an Dutzenden von Fällen mit fortgeschrittenen, inoperablen Karzinomen und als Entwöhnungskur an Rauschgiftsüchtigen erprobt.

Aus Gründen der Anschaulichkeit und besseren Vorstellung werden zwei Fälle aus "ARTIFICIAL HIBERNATION THERAPY" von M.K. Newman (7) zitiert:

Alter	38-jähriger Mann	30-jähriger Mann
Diagnose	Magenkarzinom mit lokaler Tumorausbreitung	Teratom des rechten Testi- kel. Metastasen in der re. Lunge. Heftige Hüftschmer- zen.

Behandlung Allgemeine Hypothermie

über 120h bei 85-88°F

72h bei 85-88°F

Ergebnisse 4 Monate lang frei von Völlige Schmerzbefreiung
Symptomen.(Der Patient
ging wieder seinen
Geschäften nach.)

Bemerkungen Nachweis von Metastasen Für 2 Wochen Erleichterung,
im rektalen Bereich dann Rückfall.
Die ursprünglich geschätzte
Lebenserwartung betrug 2 Monate.
Er lebte 5 Monate!

Von 14 Patienten starben 3 mit folgenden Symptomen:

Cyanose und flache Atmung.

Mesenterialthrombose.

Akute Pankreasfettnekrose.

In einem Fall mit primärem Leberadenokarzinom konnten bei der
Biopsie regressive Tumorveränderungen festgestellt werden.

Auswirkungen der allgemein reduzierten Körpertemperatur
nach L.W. Smith (3):

Herz: Regelmäßig auftretende Reduzierung der T-Welle und
Verlängerung des Vorhof-Kammerkomplexes im EKG.

Die Autopsie ergab in 5 tödlichen Fällen:

Extensive myocardiale Degeneration mit kennzeich-
nenden wässerigen und fettigen Veränderungen des
Cytoplasmas.

Abnahme der Pulsfrequenz(nach Jones).

Lunge: Verringerung und Abflachung der Atemexkursionen (Jones).

Bei Metastasen in der Lunge traten Zeichen einer
hypostatischen Pneumonie auf (Atelektase).

Nieren: Nur bei bestehender Obstruktion durch ein Blasen- oder Prostatakarzinom wurden pyelonephritische Krankheitsbilder beobachtet.

Mc Cravey und Newman registrierten ein Ansteigen des Rest-N und des Kreatinins.

Jones, Graham und Mueller beobachteten bei eingeschränkter Nierenfunktion Albuminurie, Acetonurie, granulierte und hyaline Zylinder.

Blut: Anstieg des Hämoglobingehaltes und der Zahl der roten und weißen Blutzellen.

Jones u.a. erklären dies als Konzentrationseffekt durch Flüssigkeitsansammlung in der Muskulatur und teils als direkte Beeinflussung des hämopoetischen Systems, da die neutrophilen Granulocyten einseitig vermehrt sind.

Als Erfolge der allgemeinen Hypothermiebehandlung werden von L.W. Smith (3) genannt:

- a) Verlängerung der Lebenserwartung.
- b) Schmerzerleichterung, ohne auf ständig steigende Dosen an Narkotikas angewiesen zu sein.
- c) Verringertes Tumorwachstum und geringe Regression (nach mindestens 120-stündiger Hypothermie).

Exakte Beweise konnten nicht geführt werden.

Bedeutung erlangten lediglich physiologische Erkenntnisse (sinngemäß zitiert in 6):

Swift: Die Wärmeproduktion ist proportional zur Intensität des Kältezitterns der Muskulatur!

Britton bewies in Tierversuchen, daß Warmblüter ohne geringste Zeichen von Erkrankungen bis auf 60,8°F (16°C) abgekühlt werden können.

Suomalainen (London, 1938) gelang es Tiere durch intra-venöse Injektionen von Insulin und Magnesiumchlorid in einen künstlichen Winterschlaf (= Hibernation) zu versetzen.

L.W. Smith (3) erzeugte in histoembryologischen Studien an vorher bei 101°F incubierten Eiern durch Unterkühlung Entwicklungsstörungen. Seine wichtigsten Aussagen lauten sinngemäß:

Unter 90°F (32°) erfolgen eine Verzögerung des Zellwachstums und regressive Veränderungen bis zur Nekrose.

Für embryonale (unreife) Zellen kritische Temperaturbereiche haben keine signifikante Wirkung auf normale, voll differenzierte Körperzellen.

2) . DIE LOKALE KÜHLBEHANDLUNG

L.W. Smith (3) beobachtete, daß lokale Kälteanwendung wirksamer zu degenerativen Veränderungen in Tumoren führt als die allgemeine Reduzierung der Körpertemperatur.

Praktische Durchführung

Fast ausnahmslos gebrauchte man ein geschlossenes System mit zirkulierendem Kühlwasser von 35-50°F (1¹/₂-10°C), das von einem Eisbehälter durch eine Pumpe die Gummischläuche zu den lokalen Applikatoren speiste, die ebenfalls aus Gummi oder aus Metall bestanden und der Form des mit Krebs befallenen Organs angepaßt werden konnten.

Mit diesem Verfahren versuchte man, alle zugänglichen Karzinome lokal abzuheilen, vor allem aber das Mamma-

karzinom, das Rectum- und das Blasenkarzinom.

Um einen Einblick in diese Art von Behandlung zu geben, führe ich einen Fall mit Blasenkarzinom von Mc Cravey aus dem Temple University Hospital in Baltimore an (5):

S.H., ein 49 Jahre alter Mann, wurde am 8. Aug. 1939 mit der Diagnose Blasenkrebs eingewiesen. Die Symptome begannen vor 2 Jahren mit häufigem Wasserlassen, Dysurie und Hämaturie.

Durch eine weite suprapubische Cystostomie wurde eine große schwammige und ulcerierte Tumormasse in der oberen seitlichen Blasenwand, die sich bis zum Blasen Hals erstreckte, dargestellt und als undifferenziertes Zellkarzinom, Grad 4, typisiert.

Nachdem die Wunde geheilt war und die Fäden entfernt wurden, begannen sie am 25. August 1939 die Kühlbehandlung bei 40°F ($4\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$) mit einem Metallapplikator, der direkt auf den Tumor gelegt wurde. Die Zuleitungen für Kühlwasser und Urinsaugdrainage verliefen durch ein permanentes, suprapubisches Cystostom.

Die Schmerzen ließen sofort nach und die nach einem 10-tägigen Intervall entnommenen Biopsien zeigten ausgeprägte degenerative Veränderungen. Nach einem Monat waren keine definitiv identifizierbare Tumorzellen vorhanden.

Die Kühlbehandlung mußte nach einem Monat unterbrochen werden, da sich eine Pyelonephritis entwickelte. Nach 3-wöchigem Aussetzen zeigte die Biopsie eine Rückkehr vitalen Tumorgewebes mit mitotischen Figuren.

Die Kühlbehandlung wurde erneut aufgenommen und die Biopsien bestätigten wieder extensive, regressive Veränderungen.

Nach 112 Tagen mußte die Kühlbehandlung wegen der Pyelonephritis abgebrochen werden und bevor alle lebensfähigen Krebszellen zerstört waren, starb der Patient an Urämie.

(Später gaben Mc Cravey und M.K. Newman prophylaktisch Sulfonamide gegen die sich entwickelnden Pyelonephritiden.)

Die Autopsie zeigte in der Blase keinen nachweisbaren Tumor, wohl aber außerhalb längs des linken Ureters.

Nachteile der lokalen Kühlbehandlung:

Oberflächliche, langsame Tumornekrose.

Langwierige Behandlungsdauer über 40 bis 120 Tage und mehr!
Große Gefahr einer ascendierenden Infektion und Ausbildung einer Pyelonephritis.

Als hervorragende Palliativeffekte können zweifellos angesehen werden:

Schmerzstillung

Verzögertes Wachstum oder Regression des Karzinoms.

Pathohistologische Veränderungen

L.W. Smith (3) betonte, daß normale stützgewebliche und differenzierte Zellstrukturen nicht nachweisbar durch Kühltherapie getroffen werden und die Abheilung erheblich ulcerierter Flächen gleichzeitig mit der Regression der Krebszellen fortschreitet!

Diese Aussage ist ein Beweis für die selektive Zerstörung von Tumorzellen durch Gewebsunterkühlung.

Smith stellte fest, daß die Regression von Tumorzellen umso schneller eintritt, je undifferenzierter der Zelltyp eines Karzinoms ist. Die Sensibilität eines Sarkoms gegen Kälte ist viel geringer als die eines Karzinoms.

Die Wirksamkeit einer Kühlbehandlung hängt also vom Grad der Zelldifferenzierung einer bösartigen Geschwulst ab!

Die Erscheinung der Regression kann folgendermaßen zusammengefaßt werden:

- a) Granuläre, wässerige und fettige degenerative Veränderungen des Cytoplasmas, die weitgehend von Differenzierung und Abkunft der Zellen (Typus) abhängen.
- b) In vielen Fällen ist die Kern-Plasma-Relation verzerrt, so daß man sie als geringen Beweis einer cytoplasmatischen Veränderung werten kann.
- c) Häufiger sind Kernpyknosen zu beobachten, gelegentlich auch karyolytische Anschwellungen, die in einer Ruptur der Kernmembran enden.
- d) Je undifferenzierter Tumorzellen sind, besonders wenn sie der epithelialen Reihe angehören, umso schneller und extensiver treten die regressiven Zeichen auf.

Mehrere Autoren, wie z.B. L.W. Smith (3), Mc Cravey (5) und M.K. Newman (7), weisen darauf hin, daß histologisch die Zellveränderungen bei Kälteeinwirkung nicht sehr verschieden von denen nach Röntgenbestrahlung sind und sich eine gesteigerte Strahlensensibilität nach Kältebehandlung ergebe.

Vielleicht ließe sich diese Hypothese als Summations-effekt der analogen pathologischen Veränderungen erklären. Beide physikalischen Therapien, sowohl die Kälte- als auch die Strahlenbehandlung, lassen die Intima der Gefäße quellen und teilweise verkleben.

II. GEFRIERMETHODEN

1) HETEROGENE NUCLEATION

Heterogene Nucleation erfolgt bei langsamem Gefrieren und führt zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Eiskristalle, die sich nur extrazellulär ausbilden. Unter mikroskopischer Betrachtung sieht man Eiskristalle in den Zellspalten wachsen und sich zusammendrängen, während sich das Zellinnere bis auf ungefähr -5°C unterkühlen kann. Es scheint, als ob die Zellmembran gleichsam als Barriere gegen eindringende Eiskristalle wirkt.

Die folgenden Seiten wollen eine Vorstellung über wesentliche physikalisch-chemische Vorgänge, strukturelle und biologische Veränderungen vermitteln.

Zuerst schildere ich einen Modellversuch, den Moran (8) im Jahre 1935 unternahm:

Bei Abkühlung von Gelatinekugeln in Wasser bilden sich Eiskristalle an der Außenseite, die an Zahl zunehmen und sich ausbreiten, bis ein Großteil der außen befindlichen Flüssigkeit in den festen Aggregatzustand umgewandelt ist. Auf Grund von Dampfdruckdifferenzen setzt eine Wasserdrift von dem Inneren der Gelatinekugel nach außen ein.

(Dieser spationierte Wasserentzug bei zunehmendem Wachsen der extrazellulären Eiskristalle bildet das Prinzip der Gefriertrocknung.)

Durch den Wasserverlust kontrahiert sich das Gebilde. Verblüffend wirkt, daß nicht von außen durch das Eis eine Kompression erfolgt.

Diese Tatsache widerspricht einer älteren, populären Erklärung(Theorie nach Maximov), daß Zellen tödlich getroffen wurden, indem sie durch Eiskristalle angespießt und zerquetscht werden.

Zur weiteren Entkräftung dieser Anschauung können Smith, Polge und Miles (1951) angeführt werden (9):

Sie kühlten Amöben auf -5°C . Die sich im Medium ausbildenden Eiskristalle wuchsen, bis sie die Amöben umgaben und sie offensichtlich am weiteren Ausbreiten gehindert wurden. Die angrenzenden Kristalle hatten abgerundete Ecken und es fand sich kein Anhalt, daß sie die Zellmembranen einschnitten oder durchstachen. Die Amöben behielten ihre Form und Durchsichtigkeit.

DIE LETHALEN VORGÄNGE BEI HETEROGENER NUCLEATION

Der kritische Temperaturbereich von -3 bis -40°C , in dem Zellen einer gefährlichen Konzentration ihrer Elektrolyte ausgesetzt sind, ist mit dem der heterogenen Nucleation weitgehend identisch. Als tiefste Temperatur, der die meisten Säugetierzellen mit ihrem Überleben vereinbar ausgesetzt werden können, gelten ungefähr -5°C .

Die Konzentrationstheorie nach J.E. Lovelock (London, 1954)

Um die Lethalität des Gefrierens zu enträtseln, hilft die Betrachtung des Gefriervorgangs in verdünnten Salzlösungen, welche dem extrazellulären Milieu entsprechen.

In Lösungen trennen sich Eiskristalle als reine Substanz ab und die Elektrolyte konzentrieren sich infolge des Wasserentzugs. Das Schicksal einer Zelle hängt von ihrer Widerstandsfähigkeit gegen Konzentrationssteigerungen ab.

Bei -1°C erreicht die Elektrolytkonzentration den zweifachen Wert, bei -3°C den sechsfachen und bei -5°C den zehnfachen Wert!

Zellen, die eine höhere Wasserpermeabilität zeigen wie die meisten Säugetierzellen und Zellen mit einer großen Oberfläche (Membranfläche!) im Verhältnis zum Eigenvolumen bleiben während des Gefrierens mit ihrem Suspensionsmittel im osmotischen Gleichgewicht. Sie werden bei fortschreitender extrazellulärer Eiskristallbildung durch spationierten Wasserentzug zunehmend entwässert und erleiden extra- und intrazellulär eine toxische Konzentrierung der Elektrolyte. Die meisten Zellen sind irreversibel geschädigt, lange bevor sich die Salze des Suspensionsmittels bis zur Sättigung anreichern. Zahlreiche Versuche an verschiedenen Zellarten ergaben, daß -5°C die tiefste Temperatur ist, bei der Zellen langsam ohne Schaden gefroren werden können. Das physiologische Milieu besitzt dann beinahe die zehnfache Konzentration und schädigt in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer die Zellmembranen.

Ausnahmen:

Hautzellen ertragen eine Gefriertrocknung bis auf -32°C mit Wasserverlusten bis zu 75 % (nach Medawar und Billingham, 1951, angeführt in [10] S.441).

Als Erklärung drängt sich die geringe Permeabilität ihrer Zellmembran auf.

Die Überlebensrate von pathogenen Protozoen, Bakterien und manchen Tumorzellen ist bei langsamer Kühlung höher als bei schnellem Temperaturabfall auf denselben Wert (nach Weissman und Mc Allister, 1947, Breedis, 1942, angeführt in [10] S. 441)

Zellen tolerieren eher eine verlängerte Einwirkung konzentrierter Salzlösungen als einen raschen Temperaturabfall, der intrazelluläres Gefrieren oder homogene Nucleation verursacht.

Viele Krebszellen können langsames, begrenztes Gefrieren überleben!

J. Craig (12) stellte in "SURVIVAL AND PRESERVATION OF TUMORS IN FROZEN STATE" fest, daß langdauernde heterogene Nucleation bei Säugetierzellen in der Regel lethal wirkt, außer bei Schilddrüsen-, Nebenschilddrüsen-, Hypophysen-, Amnion- und vielen Krebszellen.

Diese Gründe verlangen das theoretische Postulat, für eine wirksame Cryochirurgie den Bereich der heterogenen Nucleation zu durchschreiten und durch rasche, tiefe Gefrier-schritte immer eine homogene Nucleation zu garantieren.

Folgender Gedankengang läßt sich als theoretischer Einwand gegen die heterogene Nucleation ableiten:

1935 stellte die Pathologin Howard fest(13):

Neoplastische Zellen haben einen höheren Wassergehalt.

Wenden wir nun konsequent die Konzentrationstheorie nach Lovelock an, so erleiden bei heterogener Nucleation (extrazelluläre Eiskristallbildung) normale Gewebszellen früher die toxische Konzentrierung der Elektrolyte als wasserreiche Krebszellen.

Da größerer Wassergehalt (Krebszellen) und geringere Permeabilität (Hautzellen) weitgehend eine Membraneigenschaft ist, schädigen konzentrierte Salzlösungen bevorzugt die Zellmembranen.

(Dies ist lediglich eine eigene theoretische Folgerung)

DER ORT DER GEFRIERLÄSION

Konzentrierte Elektrolytlösungen besitzen einen lyotropen Effekt auf Zellmembranen.

Die Zellmembran enthält reichlich Phospholipide, wie Lecithine, Cholesterin und Lipoproteinkomplexe.

Nach Moskowitz und Calvin (1952, angeführt in [10], S.418-440) ist beispielsweise die Zellmembran roter Blutkörperchen aus Lipoproteinfibrillen zusammengesetzt, die parallel zur Oberfläche angeordnet und durch lösliche Lipide verkittet sind.

Lovelock (1957, angeführt in [10] S. 418 - 440) bewies, daß der Verlust an Phospholipiden und Cholesterin proportional zur Abkühlung oder Elektrolytkonzentrierung erfolgt. Bei Untersuchungen an roten Blutkörperchen stieg die Hämo-lyserate mit dem Verhältnis Cholesterin zu Phospholipiden an.

Die Zellmembranen verlieren bei extrazellulärem Gefrieren und toxischer Konzentrierung der Elektrolyte selektiv Phospholipide und werden für Wasser und Ionen durchlässiger. In der Auftauphase führt die gesteigerte Permeabilität zur Wasserintoxikation oder zum Platzen der Zellen.

Zum Beispiel werden die Zellmembranen roter Blutkörperchen in über 0,8 molaren Kochsalzlösungen für Kationen durchlässig. Die Hämolyse tritt sofort ein, sobald die Zellen wieder ein isotonisches Medium erhalten, wie es beim Auftauen gefrorenen Gewebes geschieht.

In Elektrolytlösungen, die stärker als 2 molar konzentriert sind, ist die strukturelle Vollständigkeit tierischer Zellen aufgehoben (nach Lovelock, 1953).

GEFRIERMETHODEN IM BEREICH DER HETEROGENEN NUCLEATION

Ballontechnik

Die Ballontechnik der Magenschleimhautgefrierung nach Wangenstein (14) u.a. wurde von Rudolph und Schenk (15) modifiziert und in Tierversuchen auf die therapeutische Wirksamkeit aller auf die Mucosaschicht der Blase begrenzten tumorösen Erkrankungen (Carcinoma in situ und multizentrisch entstehende, rezidivierende Papillome) erprobt.

Beschreibung der Methode nach R.P. Gibbons, 1966 (16):

In einem über einen Dispersionskopf gestülpten Ballon zirkuliert eine Kühlflüssigkeit (95%iger Äthylalkohol), welche den zuvor zusammengefalteten und per urethram eingeführten Gummiballon auf eine Wandstärke von weniger als 1/40 mm auftreibt.

Die zwischen Gummi und Blasenwand befindliche Luft oder Flüssigkeit wird abgesaugt. Die Kühlflüssigkeit wird über einen koaxialen Katheter dem Dispersionskopf zugeführt, der sie räumlich verteilt und gleichzeitig ableitet. Das angeschlossene, speisende Kühlaggregat besteht aus einer Tiefkühlanlage mit Wärmeaustauscher und Thermostat (Swenko Magenkühlmaschine).

Die Versuche an 33 Hunden hatten als erklärtes Ziel die vollständige, sichere Zerstörung der Blasenschleimhaut, was in keinem Fall erreicht werden konnte. Selbst die günstigsten Erfolge, nämlich die mit einer Mucosadestruktion von 75-95% der Oberfläche, besaßen eine so erhebliche Variation der Parameter, daß sich keinerlei Gesetzmäßigkeiten ableiten ließen.

Wichtigste Parameter:

Durchströmung 300-1000 cm³/min,

Temperatur der rückströmenden Flüssigkeit -10 bis -17°C,

Gefrierdauer 48 bis 78 min,

Auftauzeit 2,5 bis 18 min (vom Ende der Kühlung bis
zum Erreichen von 0°C).

PATHOLOGISCHE BEFUNDE: nach Gibbons (16)

5 Tage nach dem Gefrieren:

Mucosaläsionen sind fleckig über die Oberfläche verteilt, erfassen immer gleichzeitig die Submucosa und einen Teil der Muscularis und zeigen eine scharfe Abgrenzung zwischen betroffenem und normalem Gewebe. Die abgestorbene Schleimhaut lag häufig lose in der Blase. Mikroskopische Schnitte bestätigen nur vereinzelt die angestrebte, selektive Zerstörung der Schleimhaut in kleinen zerstreuten Arealen oder Übergangszonen.

Gewöhnlich bot sich aber das Bild einer teilweisen oder die volle Dicke der Muscularis erfassenden Koagulationsnekrose.

Weitere hervorstechende Veränderungen waren:

die auf die Auftauphase folgende Kongestion und Hämorrhagie,

die anfangs akute und später chronische entzündliche Reaktion (Lymphocyten- und Plasmazellinfiltration in kälte- nekrotischen Gebieten),

das Gefrierödem,

die gesteigerte interstitielle Fibrose
und die Thrombosierung kleiner Gefäße.

Die Mucosa wurde manchmal von der hyperämischen Submucosa durch ödematöse oder hämorrhagische Blasen abgehoben; sie war jedoch in der Regel durch eine dicke Kruste aus Fibrin und entzündlichem Zellmaterial ersetzt.

In keinem Fall konnte eine Obstruktion der Uretermündungen festgestellt werden.

Komplikationen:

Geringfügige Hydroureterenephrosis (in 7 von 33 Fällen).

Sie wird vielleicht durch das vorübergehende Gefrier-
ödem der pars intramuralis ureteris ausgelöst.

Adhäsionen zwischen der Blase und anliegenden Organen fanden sich regelmäßig! (In der Kongestionsphase wird an der Serosafläche Fibrin ausgeschwitzt, das zu Verklebungen führt.)

Teilnekrose einer anliegenden Dickdarmschlinge in 1 von 33 Fällen.

Besonders ist die Rectumschleife des Colon sigmoideum gefährdet.

Kleine Areale mit oberflächlichen Nekrosen in der Urethra bei 3 Tieren.

Wertung:

Die Ballontechnik garantiert weder eine vollständige oder gezielte Schleimhautzerstörung, noch bleibt die Cryonekrose auf die oberflächlichen Schichten beschränkt.

Die von Gibbons vermutete und erwünschte selektive Zerstörung von Tumorzellen läßt sich mit diesem langsamen Gefrierverfahren auf keinen Fall verwirklichen, da Krebszellen auf Grund ihres höheren Wassergehaltes (nach Howard, 13) nach

der Theorie von Lovelock (11) die toxische Konzentrierung ihrer Elektrolyte länger und bis zu tieferen Temperaturen ertragen als normale Somazellen. Als Beweis dieser Schlußfolgerung kann J. Craigie (17) zitiert werden, der in Versuchen feststellte, daß bei sonst lethaler heterogener Nucleation viele Krebszellen überleben.

Erwähnenswert ist noch der Versuch, die unvollständige, ungleichmäßige und fleckige Schleimhautzerstörung zu erklären:

- 1) Topographisch anliegende Organe und Gewebsteile üben durch Wärmeaustausch einen Schutz aus.

(Nach Gibbons zeigte der Thermistor der hinteren Blasenwand, welche Kontakt mit der Rectumschleife des Colon sigmoideum, dem Uterus, den Vasa iliaca und Dünndarmschlingen besitzt, stets eine höhere Gewebstemperatur an.)

- 2) Das Phänomen der gemusterten Gefrierläsion

Es trifft als allgemeine Erscheinung auf alle Körperteile zu. Meryman (17) vermutet als Uraache ein unterschiedliches, bisher unbekanntes zellphysiologisches Verhalten.

Folgende Erklärung drängt sich auf:

- a) Die topographische Lage histologisch verschiedener Gewebsanteile mit unterschiedlicher Wärmeleitung, wie blutreiches Muskelgewebe und isolierendes Fettgewebe, bedingt bei Abkühlung eine mannigfaltige Variation an Wärme- und Kältezonen.
- b) Die irreversible Lähmung der Gefäße oder die zum Teil erfolgende Thrombosierung des Gefäßbaumes fördert die Kontrastbildung des Gefrierschadens von

durch große Arterien gut durchbluteten zu gefäßarmen, blutleeren Regionen. Die Frostgangrän wird durch Ischämie hervorgerufen.

- c) Kältezittern oder isometrische Kontraktion der Muskeln wirkt der Unterkühlung entgegen.

Die oben genannten Gründe genügen, um eine topographische Variation der Bedingungen zu schaffen, die Gefriernekrosen setzen, wie

Geschwindigkeit der Abkühlung,
Temperaturminimum des Gefriervorgangs
und Tempo der Auftauphase.

2) HOMOGENE NUCLEATION

Die homogene Nucleation liefert eine gleichmäßige Verteilung der Eiskristalle, sowohl extrazellulär als auch intrazellulär.

An diese Bedingung ist die Definition geknüpft und es liegt durchaus im Bereich der Möglichkeit, daß eine heterogene Nucleation nach Absinken der Temperatur auf einen kritischen Wert, der variabel an die Membraneigenschaften der Zelltypen gebunden scheint, in eine homogene Streuung der Eiskristalle übergeht.

DER PHYSIKALISCHE VORGANG DES GEFRIERENS UND AUPTAUENS

Zur Demonstration dient der klassische Modellversuch von Meryman (18) an einem Gebilde aus 5%iger Getreidestärke, um die Wärmeverteilung in verschiedenen Schichttiefen studieren zu können.

Gefrieren:

Die Oberfläche gefriert zuerst. Da der Wärmeaustausch von Eis fast 10 mal höher als der von Wasser liegt, fällt die Oberflächentemperatur sprunghaft unter 0°C , während im Zentrum die Temperatur weit über dem Gefrierpunkt bleibt, obwohl beachtliche Temperaturgradienten bestehen. Trotzdem breitet sich der Frostwall relativ rasch aus, da die von der Oberfläche zur Tiefe zunehmende Eisschicht eine verbesserte Wärmeableitung bietet.

Es ist nur schwierig, eine einheitliche Wärmeverteilung im Temperaturbereich von -3 bis -40°C zu erreichen. Um diese Unsicherheit bei einer geforderten Cryonekrose zu vermeiden, liegt es nahe, einen raschen Gefrierschritt auf tiefe Temperaturen zu wählen.

Auftauen:

Die gefrorene Oberfläche schmilzt zuerst. Da die Wärmeleitung von Wasser wesentlich geringer als die von Eis ist, bildet die aufgetaute Oberfläche eine wirksame Isolationsschicht, die sich bei ansteigender Temperatur vergrößert. Daran zeigt sich, daß zum Auftauen erheblich größere Temperaturgradienten oder Zeitintervalle benötigt werden als zum Gefrieren.

Je länger^{sich} aber ein Gewebe im gefrorenen Zustand im Temperaturbereich zwischen -40 und 0°C befindet, mit umso höherer Wahrscheinlichkeit treten wandernde Rekristallisationszonen auf (nach L.R. Rey, 19).

Der Effekt der Umgruppierung kleiner Kristalle zu größeren ist für eine sichere Gewebszerstörung durchaus wünschenswert, da die Wirkung einer mehrfachen Wiederholung des Frostens gleichkommt. Die winzigen, zahlreichen Kristalle des primär äußerst rasch erfolgten Gefriervorgangs bilden sich zwangsläufig in den auftauenden Gewebsschichten in einem Wechsel von Einschmelzung und Rekristallisation zu größeren Eiskristallen um. Langsames Auftauen differenziert Gewebe in Zonen unterschiedlicher Wärmeleitung und Isolation, die örtlich jeweils nach dem Grad ihres Gefrier-

zustandes wechseln. Die bei Umkristallisationen verbrauchte und freiwerdende Schmelzwärme stört das sich ausbildende, ohnehin geringe Temperaturgefälle.

Nach dieser makroskopischen Betrachtung des Gefriervorgangs im Gewebe möchte ich einen Eindruck von der mikroskopischen Bilderfolge der homogenen Nucleation vermitteln, der selbst bei rascher Abkühlung eine kurze Phase der heterogenen Nucleation voraussetzt.

Versuch nach Smith, Polge und Smiles (1951, angeführt in [10], S. 409 - 418) und Chambers, Hale (1932):

Bei Unterkühlung von Süßwasseramöben auf unter -5°C bilden sich im Medium Eiskristalle aus, die solange zahlenmäßig wachsen, bis sie die Einzeller umgeben. Die Kristalle haben abgerundete Ecken und es besteht kein Zeichen, daß sie die Zellmembran mechanisch malträtieren. Die Amöben behielten ihre Form und konnten wieder erfolgreich aufgetaut werden, was sich an innerer Plasmaströmung und Konturenwechsel ablesen läßt.

Nach der deutlichen Phase der Unterkühlung und extrazellulären Eiskristallbildung verfinstert sich unter -8°C plötzlich das Zellinnere. Im Cytoplasma und in den Vakuolen werden kleine Kristalle sichtbar. Das Abdunkeln läßt sich durch Lichtstreuung an den Flächen zahlloser Kristalle erklären. Intern gefrorene Amöben können niemals wiederbelebt werden. Ihr Aussehen gleicht einem ausgebreiteten, koagulierten Netz.

Die Zellmembran ist an mehreren Stellen aufgerissen und cytoplasmatisch. Granula treiben in den extrazellulären Raum.

Das Zeitintervall zwischen extra- und intrazellulärer Eiskristallbildung kann prinzipiell durch schnelleres Abkühlen verkürzt werden.

THEORIE DER HOMOGENEN NUCLEATION zur Erklärung der spontan auftretenden intrazellulären Eiskristallbildung nach der Hypothese von P. Mazur (20)

Zellen zeigen eine große Neigung zur Unterkühlung, zumal eine geringe Wahrscheinlichkeit besteht, daß sich in einem so kleinen Volumen ein Kristallisationskern von ausreichender Größe findet. Der Durchmesser der Kristallisationszentren zur Eiskristallbildung nimmt von unendlich groß bei 0°C bis auf anorganische Molekülproportionen bei -100°C ab. Es ist erwiesen, daß Zellmembranen mit Flüssigkeit erfüllte Kanäle enthalten, deren Durchmesser im Bereich von Ångströmeinheiten liegen. Bei relativ hohen Temperaturen, wie z.B. -5°C , gefriert das extrazelluläre Wasser, aber der kritische Durchmesser der Kristallisationskerne ist viel größer als der von Membrankanälen. Bei Temperaturabfall werden die kritischen Durchmesser immer kleiner und nähern sich denen der Kanäle an.

Bei -15°C beträgt der kritische Radius $25 \text{ \AA}$!
Im Bereich von -5°C bis -15°C können Eiskristalle durch die Kanäle der Zellmembran passieren und durch Einstreuung das intrazelluläre, unterkühlte Wasser gefrieren lassen.

Nach der Theorie von Lovelock (11) konzentriert sich bei extrazellulärer Eiskristallbildung das physiologische Milieu, indem sich Eis als reine Substanz von der Lösung abtrennt. Zwischen der gefrorenen extrazellulären Flüssigkeit und dem nur unterkühlten Zellinnern bilden sich osmotische Druckdifferenzen aus, die für den spationierten Wasserentzug aus dem Protoplasma verantwortlich sind.

(Bei reinem Wasser würden sich Dampfdruckdifferenzen an Stelle der osmotischen einstellen.)

Bei langsamem Kühlen werden die Zellen gefriergetrocknet, so daß sich zeitliche Parameter für jede Zellart finden lassen, innerhalb deren Grenzen Zellen zu entwässert werden, um bei einem anschließenden schnellen Temperaturabfall beliebigen Grades gefrieren zu können. Dieser Vorgang der langsamen Gefrieretrocknung und der raschen Abkühlung auf tiefste Temperaturen unter -80°C , um autolytische Prozesse zu unterbinden, wird als ZWEISTUPENEFPEKT bezeichnet, durch den Zellen überleben können. (Luyet B.J.,

Keane J.JR., 21)

Da wir Forderung nach sicherer Cryonekrose aller Zellen gestellt haben, müssen wir von Anfang an ein rasches Gefrierverfahren wählen. Denn die bisher unumstrittene dominante Erscheinung des Gefriertodes von Zellen ist die intrazelluläre Eiskristallbildung!

Es gibt bisher trotz intensiver Forschungen nach

A.U. Smith (10) nur eine Ausnahme:

Salt (1959, angeführt in [10] , S. 409 -418)

demonstrierte an der goldschwänzigen Gallwespe

Eurosta solidaginis, daß deren große Fettkörperzellen intrazelluläres Gefrieren zwischen -15 und -25°C überlebten. Die einzige wesentliche Veränderung trat an Fetttropfen auf, die in den Zellen zusammenflossen.

AUFKLÄRUNGSVERSUCHE UND BEWEISE FÜR DIE LETHALITÄT DER HOMOGENEN NUCLEATION

Der wichtigste Beweis ist die praktische Erfahrung, daß Säugetierzellen intrazelluläre Eiskristallbildung nicht überleben! (Sinngemäß nach A.U. Smith [10], S.409-418).

1) Strukturelle Veränderungen

Trump, Goldblatt, Griffin u.a. (22) berichten über Gefrier- und Auftaueffekte an Ultrastrukturen von Mäuseleberzellen anhand von licht- und elektronenmikroskopischen Bildern:

Bei schneller Abkühlung stellten sie Veränderungen an der Zellmembran und an intrazellulären Membransystemen fest. Sie schlossen, daß sich die Veränderungen in unmittelbarer Nähe der Eiskristalle ereignen und erhebliche Folgen für den Zellstoffwechsel haben.

Letzteres zeigt sich:

- a) in einer gesteigerten Permeabilität für Flüssigkeiten,
- b) durch Platzen der Zellen in der Auftauphase,
- c) in der Dissoziation membranorientierter Enzymsysteme. (Bekanntlich sind im Ergastoplasma oder endoplasmatischen Retikulum Enzyme gebunden als "Fermentfließbänder" vorhanden.)

Weiss und Armstrong (1960, angeführt in [10], S.418) betrieben elektronenmikroskopische Studien über die morphologischen Veränderungen von Sarkom- und menschlichen Cervixkarzinomzellen, die auf -79°C abgekühlt und wieder rasch aufgetaut wurden:

Die aufeinanderliegende Doppelschicht der Kernmembran trennte sich voneinander. Große perinucleäre Bläschen bildeten sich offensichtlich als lokale Auftreibung innerhalb der Kernmembran. Das Kernchromatin wies unregelmäßige Verklumpungen auf und die meisten stärker betroffenen Zellkerne hatten ein charakteristisch bleiches Aussehen. Die dichten Nucleoli waren nicht ergriffen. Das Cytoplasma enthielt Bläschen, von denen einige in den Doppelmembranen der Mitochondrien entstanden sein dürften, wie die zerrissenen, noch erkennbaren Überbleibsel der membranösen Cristae zeigten. Andere Bläschen schienen mit dem endoplasmatischen Retikulum in Verbindung zu stehen.

(Übersetzt aus " BIOLOGICAL EFFECTS OF FREEZING AND SUPERCOOLING"

von A.U. Smith, 1961, S.418)

2) Physiologisch-chemische Auswirkungen

DENATURIERUNG VON ZELLPROTEINEN

1932 denaturierte Finn (angeführt in [10], S.441-443) Zellproteine aus dem Preßsaft von Ochsenmuskelfasern bei -2 bis -3°C.

Die KCL-Konzentration stieg von 0,3 auf 0,8 molar, als 78% des Wassers zu Eis konvertierten. Der pH-Wert sank auf 6.

Durch Trocknung und Ansäuerung erreichte er das gleiche Ergebnis: die Denaturierung.

TOXISCHE KONZENTRIERUNG DER ELEKTROLYTE UND SELEKTIVER VERLUST AN ZELLMEMBRANEIGENEN PHOSPHOLIPIDEN

1957 fand Lovelock (angeführt in [10], S.441-443) einen proportionalen Zusammenhang zwischen der Konzentrierung der Elektrolyte, dem ansteigenden Verhältnis von Cholesterin zu Phospholipiden und der Hämolyserate roter Blutkörperchen.

Konzentrierte Salzlösungen hydrolisieren die Lecithine der Zellmembranen. Als Folgeerscheinungen treten auf:

a) Dehydrierung des Zellinnern.

Der völlige Wasserentzug durch Eisbildung könnte chemisch aktive Strukturen in einer Weise in Kontakt bringen, daß sie irreversibel gebunden oder zerstört werden.

b) Veränderung der Permeabilität der Zellmembran für Ionen und Flüssigkeiten

c) Absinken des pH-Wertes (Ansäuerung)

Dies ist ein allgemeiner Vorgang der Entzündung und des Zelluntergangs. Diese Gewebsacidose kann als Ausdruck einer Grundsubstanz-Entzündung (nach Schallock und Lindner, 23) gewertet werden. Durch Freisetzung saurer Mucopolysaccharide der Grundsubstanz wird das Säure-Basen-Gleichgewicht bei Entzündungen und Wundsekretionen verändert.

Nach Lovelock denaturierten Eiweiße bei Ansäuerung, deren isoelektrischer Punkt nahe der Neutralität liegt.

1959 bewiesen van den Berg und Rose (24), daß sich ebenfalls durch fraktionierte Ausfällung schwer löslicher Salze eines Puffersystems der pH-Wert verschiebt.

d) Veränderte Ionenverhältnisse

Manche Proteine denaturieren bei Änderung des Ionenverhältnisses von Ca zu Na und K.

e) Konzentrierung metabolischer Abbauprodukte

(Harnstoff usw.) bis zum toxischen Bereich.

Es ist leider fraglich, ob diese Argumente als "kausale Noxen" bei einem raschen Gefrierschritt zutreffen oder nachgewiesen werden können. Vielleicht würden sich handfestere Beweise für die ohne Zweifel für alle Säugetierzellen zutreffende Lethalität der homogenen Nucleation erbringen lassen, wenn es gelänge, die Konzentrationstheorie nach Lovelock auf den intrazellulären Raum von Hyaloplasma zu Ergastoplasma und Zellkern zu übertragen. Demnach würde die Modellvorstellung von der zerstörenden Wirkung konzentrierter Elektrolytlösungen für Zellmembranen auf die

kleiner dimensionierten Bereiche der Kernmembran, des endoplasmatischen Retikulums und der Zellorganellen (Mitochondrien usw.) ausgeweitet.

Nach der Theorie von Moskowitz und Calvin (1952) sind die Zellmembranen roter Blutkörperchen aus Lipoproteinfibrillen zusammengesetzt, die parallel zur Oberfläche angeordnet und durch lösliche Lipide verkittet sind.

Darauf fußend entwickelte Lovelock folgende Hypothese:

Der Thermoschock (plötzlicher Zelltod durch Gefrieren) tritt durch physikalische Veränderungen ein, die sich nach vorherigem Anstieg des Cholesterinanteiles in den Zement- oder Kittlipiden einstellen. Cholesterin schmilzt bei $148,5^{\circ}\text{C}$, Lecithin bleibt noch bei 0°C weich, so daß bei höherem Cholesterin-Lecithin-Verhältnis die Kittsubstanz bereits bei 0°C härter ist. Bei rascher Abkühlung auf tiefe Temperaturen werden die Kittlipide der Zellmembran einer plötzlichen Spannung unterworfen und falls sie hart und spröde sind, frakturieren sie.

Daß die unterschiedliche Kontraktion der strukturellen Komponenten der Zellwand die einzige tödliche Ursache des Gefrierens ist, hat niemand erwiesen. Es kann jedoch erwartet werden, daß Frostsensibilität weitgehend eine strukturelle Membraneigenschaft ist.

SELEKTIVITÄT DER CRYOCHIRURGIE

Die Vermutung im mikroskopischen Bereich selektiv Krebszellen zu zerstören und gesundes Gewebe weitgehend zu schonen, taucht erstmals 1950 in der Studie "RAPID FREEZING OF THE BLADDER" von Mc Donald, Taylor C.B. und Heckel (26) auf.

Ihr Gedankengang weist folgendes Gerüst auf:

- 1) Moran, Chambers, Luyet, Gehenio und Breedis (1929, 1932) vertreten die Ansicht:
Organismen mit geringerem Wassergehalt sind widerstandsfähiger gegen Gefrieren.
- 2) Die Pathologin Evelyn Howard (1935) stellt fest
[siehe 13] :
Neoplastische Zellen besitzen einen höheren Wassergehalt.
- 3) Mc Donald, Taylor und Heckel (1950) schließen daher:
Krebszellen werden durch Gefrieren stärker getroffen als normale Zellen.

Diese Überlegung lehne ich aus mehreren Gründen ab!

Es bestehen prinzipiell zwei Möglichkeiten, Gewebe zu gefrieren, nämlich durch langsames, temperaturbegrenztes Kühlen (heterogene Nucleation) oder schnelles Abkühlen (homogene Nucleation).

Wenden wir nun die heterogene Nucleation bei Organismen mit geringerem Wassergehalt an (Satz 1), so geraten bei Temperaturabfall diese Zellen wesentlich schneller in den toxischen Bereich der sich konzentrierenden Elektrolyte als die wasserreicheren(Lovelock's Konzentrationstheorie). Krebszellen würden noch überleben, nachdem die meisten normalen Somazellen abgestorben wären. Dieses von mir theoretisch abgeleitete Gegenargument kann von J. Craigie (12) bestätigt werden, der in "SURVIVAL AND PRESERVATION OF TUMORS IN FROZEN STATE" anführt:

"Viele Krebszellen können neben Schilddrüsen-, Hypophysen- und Amnionzellen bei langsamem Gefrieren überleben."

Unterwerfen wir ein carcinomatös infiltriertes Gewebe einer homogenen Nucleation, so hängt der Beginn der lethalen intrazellulären Eiskristallbildung nur von der Tiefe der Temperatur, der dazu korrelierten Größe der extrazellulären Eiskristalle und deren schließliche Einstreuung ins Zellinnere durch die feinen Kanäle der Zellmembran von einer bestimmten lichten Weite ab (Theorie nach Mazur, 20). Die Selektivität bei homogener Nucleation müßte also auf einer unterschiedlichen Membraneigenschaft basieren!

Überdies scheint es illusionär, in einem unter Umständen mehrschichtigen Gewebe wegen ungleichmäßiger Wärmeleitung einen raschen Gefrierprozeß auf Grade oder notwendigerweise vielleicht auf Zehntelgrade genau einzustellen oder zu bremsen.

Alle diese möglichen Einwände haben vorerst zu dem Entschluß gedrängt, für eine therapeutisch konzipierte Cryochirurgie den Gedanken der Selektivität zu verlassen und die homogene Nucleation bei tiefsten Temperaturen zu wählen, um eine sichere Cryonekrose aller Zellen zu garantieren.

Zum Schluß stelle ich eine eigene Hypothese zur Verwirklichung einer selektiven Cryochirurgie zur Diskussion.

Eine selektive Zerstörung von wasserhaltigeren, neoplastischen Zellen (Satz 2 nach Howard) kann durch ein kombiniertes, zweistufiges Gefrierschrittverfahren verwirklicht werden.

I) TEMPERATURBEGRENZTE PHASE DER HETEROGENEN NUCLEATION
ZUM ZWECKE DER GEFRIERTROCKNUNG:

(Gefriertrocknung ist innerhalb bestimmter Zeitspannen nicht tödlich.)

Die in einem infiltrierten Gewebe vorhandenen normalen und neoplastischen Zellen werden durch langsames und deshalb leichter steuerbares Abkühlen über extrazelluläre Eiskristallbildung so lange gefriergetrocknet bis die Mehrzahl der normalen Gewebszellen entwässert sind, in den Krebszellen aber Wasser verbleibt.

In vorherigen experimentellen Studien müßte die Resistenz der entsprechenden Gewebs- und Organteile gegenüber konzentrierten Salzlösungen bestimmt werden, um die optimalen Parameter zur Meidung toxischer Elektrolytkonzentrationen zu finden,

nämlich die Geschwindigkeit der Abkühlung,

die tiefste Temperatur und

die höchste tolerierbare Elektrolytkonzentration.

Da die Toleranz von Zellen gegen konzentrierte Elektrolytlösungen deutlich von der Einwirkungsdauer abhängt, so daß selbst die Grenze des toxischen Bereichs als Diagramm von Zeit und Konzentration, gemessen an der Überlebensrate oder Lethalität, dargestellt werden kann, gilt es, die Forderungen der ersten Phase näherungsweise zu erfüllen:

- 1) Schonende, möglichst vollständige Gefrier-trocknung der normalen Gewebszellen.
- 2) Die Parameter müssen so gewählt werden, daß in allen neoplastischen Zellen Wasser zurückbleibt.

II) DIE PHASE DER HOMOGENEN NUCLEATION DURCH RASCHES ABKÜHLEN AUF TIEFE TEMPERATUREN:

Durch intrazelluläre Eiskristallbildung muß die sichere Cryonekrose aller neoplastischen Zellen garantiert werden.

Die normalen Gewebszellen sind durch Gefriertrocknung zu dehydriert, um noch intrazelluläre Eiskristalle in lethalem Ausmaß bilden zu können. In Praxis dürften sich prozentuale Überlebensraten in Abhängigkeit von den angewandten Parametern ergeben.

III) SCHNELLE AUFTAUPHASE,

um die im Bereich von ungefähr -40° bis -3°C häufigen wandernden Rekristallisationen zu vermeiden.

Damit sich die wenigen, im Innern von normalen Gewebszellen befindlichen, winzigen Eiskristalle nicht zu traumatisierenden großen Kristallen umgruppieren, soll die Temperatur von -80° oder weniger sehr rasch auf 0°C erhöht werden.

Am wirksamsten hat sich hierfür Diathermie erwiesen.

Als Ergebnis dieser dreiphasigen Therapie eines krebserkrankten Organteiles könnten neben sicherer, totaler Cryonekrose aller malignen Zellen ein beträchtlicher Rest an funktionstüchtigen normalen Gewebszellen überleben, vorausgesetzt, daß nicht der versorgende Gefäßbaum thrombosiert.

EIGENE VERSUCHE

DIE APPARATUR DER CRYOCHIRURGIE

Von den physikalischen Eigenschaften des flüssigen Stickstoffs als Kühlmittel ausgehend, konzipierte ich die technischen Details der Kälteapparatur:

Flüssiger Stickstoff besitzt einen sehr tiefen Siedepunkt bei $-195,8^{\circ}\text{C}$. Seine Verdampfungswärme weist mit 38,7 kcal pro Liter einen günstigen Wert zum Wärmeentzug aus Gewebe auf. Stickstoff ist zudem ein inertes Gas, das bei Temperaturen in Operationssälen keine chemischen Reaktionen eingeht.

Die Apparatur besteht aus vier Teilen (Abb.):

- 1) dem Behälter für flüssigen Stickstoff (Linde AG, 8021 Höllriegelskreuth bei München),
- 2) der Überhebevorrichtung,
- 3) dem flexiblen Metallschlauch als Übertragungsteil,
- 4) den Sonden und Spritzdüsen, welche den Kältekontakt mit dem Gewebe herstellen.

ad 1) Der Behälter

Für Transport und Lagerung von flüssigem Stickstoff baut die Fa. Linde doppelwandige, vakuumisolierte Metallgefäße. Sie bestehen im wesentlichen aus zwei ineinander angeordneten, kugelförmigen Behältern, deren Zwischenraum zur Isolation hoch evakuiert ist. Auf der Unterseite des Vakuumsraumes liegt ein Adsorptionsmittel, welches das Hochvakuum

aufrechterhält. Die hochglanzpolierten Metalloberflächen verhindern die Wärmestrahlung von außen und sichern günstige Verdampfungswerte. Der Behälter faßt 50 l.

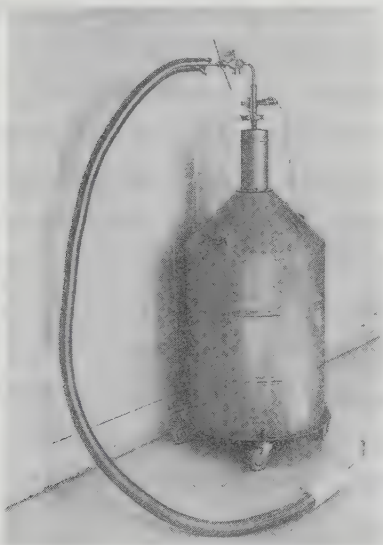


Abb. Gesamtansicht der Kälteapparatur, bestehend aus dem fahrbaren Behälter, der Überhebevorrichtung, dem flexiblen Metallschlauch und der kleinen, geschlossenen Cryosonde.

ad 2) Die Überhebevorrichtung

bestehend aus Steigrohr, Druckkammer und Reduzierventil.

Wir strebten einen einfachen, technischen Mechanismus an, um einen regelbaren Strom an flüssigem Stickstoff durch die Kälteapparatur zu schicken. Da Pumpen verschiedenster Konstruktion wegen der beträchtlichen Temperaturänderung, unterschiedlicher Wärmeausdehnung des Materials, Vereisung und Verfestigung der Schmiermittel anfällig sind, bietet sich als bessere Lösung das Überheben mit Gasdruck an.

Über dem Spiegel des flüssigen Stickstoffs im Speicherbehälter wird mit Stickstoffgas aus einer handelsüblichen Stahlbombe ein Druck angelegt, der über ein eingetauchtes, zentrales Steigrohr den flüssigen Stickstoff transportiert.

Die Überhebevorrichtung besteht aus einem langen, zentralen Steigrohr, das fast bis zum Boden des Behälters reicht. In dessen Halshöhe ist am Steigrohr ein konzentrischer, kurzer Außenzylinder angeschweißt, der mit seiner offenen, unteren Seite an den Conus des Behälters mit Dichtung und Klemmring rasch angeflanscht wird. Diese außengelegene Druckkammer besitzt einen zapfenförmigen Anschluß für den Gas Schlauch, der über ein Reduzierventil an der Stickstoffflasche von ca. 150 atü angeschlossen wird. Das Reduzierventil hat zwei Manometer: eines mißt den Druck in der Stahlflasche, das andere den mit der Stellschraube vorwähl-

baren Druck des abströmenden Gases. Der Ausgang kann zusätzlich mit einer Sperrschraube geöffnet und geschlossen werden. An der Druckkammer über dem Behälter befindet sich außerdem ein Hahn zur schnellen Druckentlastung und ein einstellbares Sicherheitsventil, das bei 0,5 atü oder durch Fingerdruck auf die Gummimanschette abbläst.

Der stabile, gebogene Außenteil des Steigrohrs endet mit einem Schraubconus zum horizontalen Anschluß des Metallschlauchsystems. Kurz zuvor ist ein Sperrhahn zwischengeschaltet, der als technische Besonderheit einen völlig wartungsfreien Teflonkegel aufweist, der sich im Gegensatz zu Metall nicht festläuft und keiner, bei den tiefen Temperaturen erfolglosen Schmierung bedarf, da Öle und Fette fest werden. Teflon, ein moderner, gesinterter Kunststoff, ist trotz seiner Festigkeit am Rande weich, nachgiebig und enorm temperaturbeständig, ohne bei tiefsten Temperaturen zu brechen oder bei Temperaturen bis 300° zu schmelzen.

ad 3) Das flexible Metallschlauchsystem als Übertragungsteil

(Abb. 2)

Es setzt sich zusammen aus dem Leitungsteil von 2 m Länge, dem hinteren, starren Anschlußende mit Abstromkammer und dem vorderen, starren 16 cm langen Handgriff mit Wechselfassung für Sonden und Spritzdüsen. Es ist das Leitungssystem, durch welches der flüssige Stickstoff zu den Kältesonden und -düsen gelangt.

Um der Erwärmung und dem Verdampfen des Kühlmittels durch

Überleitung der Kälte an die Außenhülle zu begegnen, wandte ich eine Kombination von Vakuumisolation und Gegenstromprinzip an. Drei nichtrostende Metallschläuche von 10, 20 und 32 mm Innendurchmesser werden konzentrisch ineinandergelagert, so daß ein zentraler, kreisrunder und zwei ringförmige Hohlräume entstehen. Der kreisrunde Innenraum von ca. 75 mm^2 Querschnitt dient dem Zustrom von flüssigem Stickstoff. Der darauffolgende ringförmige Mittelraum von ca. 150 mm^2 dient dem Rückstrom des verdampften Stickstoffs von der Kältesonde.

Der unvollständig verdampfte Stickstoff wird als Kühlzone um den zentralen Zustrom nach dem Gegenstromprinzip rückgeleitet bzw. gesaugt. Der innere Metallbalg läuft an einem Ende als Rohrstutzen aus, der durch eine Überwurfmutter mit Griff und Teflonring als Dichtung fest an die Überhebevorrichtung angeschraubt wird. Der mittlere Metallschlauch endet dort in einer Abstromkammer an deren conusartigen Zapfen das rückströmende kalte Gas weit entfernt vom Operationstisch austritt (Abb. 1 und 2).

Schließlich folgt auf die Rückstromzone als mantelförmige Hülle zwischen mittlerem und äußerem Metallschlauch eine Vakuumschicht. Da im Gegensatz zu den beiden inneren Bälgen der äußere, warme sich mit dem mittlern, kalten wegen Wärmeleitung nicht berühren darf, wird die Distanz im evakuierten Hohlraum von 3 mm durch isolierende Teflonringe mit je 10 cm Abstand gehalten. Alle drei flexiblen Metall-

schläuche sind aus Edelstahl, das eine schlechte Wärmeleitfähigkeit hat. Die Oberflächen sind hochglanzpoliert, damit die Wärmestrahlung vermindert auftritt. Das Hochvakuum weist den beträchtlichen Wert von ungefähr 10^{-4} mm Hg auf.

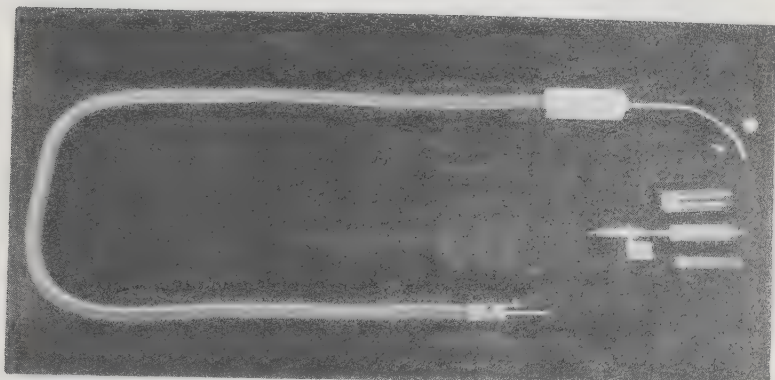


Abb. 2 Flexibles Metallschlauchsystem mit Abstromkammer am Anschlußende, mit Schutzmanschette am Handgriff, auswechselbaren Sonden und Spritzdüsen.

ad 4) Die Sonden und Spritzdüsen (Abb. 2)

Wir unterscheiden geschlossene Kältesonden und offene Spritzdüsen. Sie sind als kombinierte, austauschbare Systeme ausgelegt, um die Apparatur durch die Wahl verschiedener Einsätze vielseitig anwenden zu können.

a) Theoretische und praktische Aspekte über geschlossene Sonden

Sie ermöglichen es, den fortschreitenden Gefriervorgang im Gewebe genau zu lokalisieren. Unter und um die aufgesetzte Sondenspitze breitet sich zwiebelschalenförmig ein Frostwall räumlich aus, wobei mit zunehmender Entfernung die Temperaturgradienten in isothermaler Schichtung abfallen. Hervorzuheben ist der deutliche Übergang von dem gefrorenen, verfestigten zu dem lediglich unterkühlten, benachbarten Gewebe. Wegen des exponentiell anwachsenden Zeitbedarfs und der Verringerung des Temperaturgefälles bei zunehmender Entfernung des Frostwalls von der Sonde ergibt sich eine bedeutende Abhängigkeit der Tiefenwirkung von der kühlenden Fläche. Allgemein kann als Richtlinie gelten: Je tiefer ein Bezirk eingefroren werden soll, desto größer fällt die Form der Sondenspitze aus, um den größten Teil der Gefriermarke rasch auf Temperaturen unter -100°C absinken zu lassen und eine homogene Nucleation zu sichern.

b) Aufbau und Gestalt der geschlossenen Sonden (Abb. 2)

Sie bestehen aus einem starren, isolierten Rohrteil von verschiedener Länge, Durchmesser und Biegung mit aufschraubbaren Gefrierkugeln oder -zapfen. Der Rohrteil zeigt in seinem dreiteiligen, konzentrischen Aufbau einen zentralen Zustrom für flüssigen Stickstoff, einen Rückstrom und eine isolierende Vakuumschicht. Die abschraubbaren Aufsätze der Sondenspitze haben Hohlkammern zum Verdampfen des flüssigen Stickstoffs. Sie sind aus Silber gearbeitet, um die entwickelte Kälte optimal auf Gewebe überzuleiten.

Da die Blase ein Hohlorgan darstellt, kann die gewölbte, seitliche Blasenwand und der Blasenscheitel von Gefrierplatten schlecht erreicht werden im Gegensatz zur kugeligen Form, die auch seitlich eine günstige Auflagefläche bietet. Das Ergebnis sind zwei silberne Hohlkugeln von 35 und 16 mm $\emptyset$. Als Ergänzung dient eine zapfenförmige Gefrier Spitze von der Form eines leicht gekrümmten Fingers (Länge 70 mm, 15 mm $\emptyset$, Biegungsradius 65 mm) zur Kältechirurgie des Blasenhalbes und der pars prostatica urethrae.

c) Überlegungen zur Cryotherapie mit offenen Spritzdüsen

Als technische Alternative bot sich uns die Konzeption von Spritzdüsen an. Folgende theoretische und praktische Erwägungen veranlaßte uns, flüssigen Stickstoff direkt auf Gewebe zu sprühen:

- 1.) Die Kälteleistung eines offenen Spritzsystems übertrifft um ein Vielfaches geschlossene Sonden, da flüssiger Stickstoff in größerer Fläche verdampft. Zudem folgt die Wärmeableitung aus der Tiefe dem Gesetz:

Die pro Flächen- und Zeiteinheit abgegebene Wärmemenge ist dem Temperaturunterschied pro Entfernungseinheit proportional.

Aufgrund des innigen Kontaktes und des niedrigen Siedepunktes von direkt aufgebrachtem, flüssigem Stickstoff von -196°C kann der Temperaturunterschied hoch gehalten werden.

Der Wärmeentzug ist bei wasserreichem Gewebe günstig, da es rasch gefriert und die Wärmeleitung in Eis sich fast verzehnfacht. Das Körperinnere entspricht dieser Bedingung, da es reichlich mit Blut und Lymphe durchströmt wird. Extrem veränderte Verhältnisse treffen wir an den verhornten Plattenepithelien der Haut an. Sie wirkt in der Thermoregulation entweder als Kühler oder als Isolator mit stark zunehmendem Wärmewiderstand. Die Cryotherapie der Haut wird durch schlechte Wärmeleitung und große Widerstandsfähigkeit der Epidermiszellen erschwert, die eine Gefriertrocknung auf -32° und Wasserverluste bis zu 75% ertragen (siehe S. 16)

Deshalb erzielten wir trotz Anfeuchten der Haut mit Gefrierplatten nicht annähernd eine so beträchtliche Tiefenwirkung wie mit der Spritzmethode .

- 2.) Eine Spritzdüse kann bei einfacher Konstruktion universell eingesetzt werden, da keine Formanpassung wie bei geschlossenen Sonden für Gewebekontakt und Kälteüberleitung nötig ist.
- 3.) Leicht auswechselbare Schutzzyylinder begrenzen örtlich die Kälteeinwirkung eines frei austretenden, flüssigen Stickstoffs. Der verdampfende, stark nebelnde, flüssige Stickstoff wird aus einem Hohlzylinder von durchsichtigem Plexiglas abgesaugt, daß freie Sicht bleibt. Der sonst in feinen Tropfen zersprühende, flüssige Stickstoff kann außerhalb des aufgesetzten Hohlzylinders keine multiplen, ungewollten Kälteläsionen setzen. Das Prinzip ist folgendes:

Ein halboffener Zylinder wird durch Ansetzen auf das Gewebe zum geschlossenen.
- 4.) Mit Hilfe eines Reduzier- und Sperrventils wird der Zustrom beliebig variiert. Nach unseren Erprobungen gelingt es, sowohl verschieden kaltes Gas als auch in starkem Strahl flüssigen Stickstoff unter verschiedenem Druck austreten zu lassen, vorwählbar am Manometer zum Überhebern und am Reduzierventil zusätzlich abzuschwächen.
- 5.) Flüssiger Stickstoff ist nach unseren Erfahrungen weitgehend keimfrei und deshalb im offenen Operations-situs anwendbar.

d) Der Aufbau der Spritzdüse (Abb. 2)

Die offene Spritzdüse besteht aus einem 20 cm langen, zentralen Rohr von 4 mm $\varnothing$, das unmittelbar hinter dem Anschlußstutzen ein Teflonkegelventil zum Reduzieren und Sperren des Zustroms hat. Von vorne werden Schutzzyylinder aufgesteckt, die das gefrorene Gewebeareal auf die kreisförmige Fläche begrenzen und vor Kältenekrosen durch zersprühende Tropfen schützen. Sie sind aus durchsichtigem Plexiglas gefertigt und verschiebbar auf das Zentralrohr und drei im gleichschenkligen Dreieck, seitlich angeordnete Absaugrohre gesetzt. Dadurch kann der Abstand der Austrittsöffnung vom Gewebe eingestellt und das im Zylinder verdampfte, stark nebelnde Stickstoffgas abgeführt werden. Die Sicht bleibt erhalten. Die drei Absaugrohre sind im Ansatzstutzen abschraubbar und um 3,5 cm kürzer als das Zentralrohr, damit der Rückstrom keinesfalls Blut oder Wasser ansaugt und sich durch Eisbildung blockiert. Wir verwenden drei in gleicher Weise aufsteckbare Schutzzyylinder mit Durchmessern von 20, 30 und 40 mm. Mit Hilfe dieses offenen Spritzsystems können kleine Gefriermarken gesetzt werden, aber es gelingen auch mühelos großflächige Vereisungen in Sekunden-schnelle.

DIE REAKTION DER GESUNDEN HARNBLASE AUF EXTREME KÄTELÄSION

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN MIT FLÜSSIGEM STICKSTOFF

I. VORVERSUCHE

a) Wie breitet sich eine Gefrierläsion im Gewebe aus?

Ein schnell erfolgender Gefrierschritt verbreitet sich weitgehend unabhängig von der unterschiedlichen Wärmeleitfähigkeit oder Isolation tierischen Gewebes. Zur Standardisierung unserer Kältesonden ermitteln wir die Parameter:

Zeit, Temperatur und flächenhafte Ausbreitung des Frostwalls.

Versuchsobjekt ist ein Stück mageres Schweinefleisch. Es ist von einer Schicht Fettgewebe durchzogen. Nach Aufsetzen einer Kältesonde von fast -180°C schrumpft das unter der Gefrierplatte befindliche Gewebe augenblicklich und haftet fest. Der Frostwall breitet sich zwiebelschalenförmig in die Tiefe aus. Dabei entsteht trotz des bekannten Isolationsvermögens von Fett eine gleichmäßige, halbkugelförmige Gefriermarke. Wegen des exponentiell anwachsenden Zeitbedarfes und des sinkenden Temperaturgefälles, bestimmt nach isothermalen Schichten bei zunehmender Entfernung des Frostwalles von der Sondenspitze, hängt die Tiefenwirkung ab von der Fläche der Gefrierplatte. Hervorzuheben ist der deutliche, scharf begrenzte Übergang vom gefrorenem,

verfestigtem zu lediglich unterkühltem, angrenzendem Gewebe ohne Verwischungszone. Der Gefrierprozeß ist streng lokalisiert.

Die normale feine Musterung von Muskulatur und Fettgewebe ist aufgehoben. Rote Muskulatur verwandelt sich in einen fahlgelben Gewebsballen von uniformer Struktur. Faserbündel sind nicht zu erkennen.

Das Auftauen dauert etwa 10 min. Die zuvor bleiche Muskulatur gewinnt ihre rote Farbe und Faserstruktur zurück. Die Konsistenz gleicht der eines ungefrorenen Fleischstückes.- Das mitaufgetaute Fettgewebe hat jetzt eine weiche talgige Konsistenz. Streift man mit dem Fingernagel darüber, so bleibt an der Nagelkante ein schmieriger, fester Brei haften. Die gleiche Manipulation an gesundem Fettgewebe fördert nur etwas Flüssigkeit zutage. Dies legt die Folgerung nahe, daß das zuvor in den Zellen eingeschlossene Fett durch die Zerstörung der umhüllenden Zellmembran freigesetzt wurde, ein kleiner Beweis der membranzerstörenden Wirkung der homogenen Nucleation.

b) Direkte Berieselung eines Stückes Fleisch mit flüssigem Stickstoff

Prinzipiell lassen sich neben den geschlossenen, leicht sterilisierbaren Kältesonden als technische Alternative offene, direkte Spritzdüsen konzipieren.

In einem Vorversuch berieselte ich ein über 4 cm dickes Fleischstück von Handgröße, das in kürzester Zeit (ca. 1 min) steinhart gefroren war. Die vielfache Kälteleistung bei vereinfachter Konstruktion und Wegfall verschieden angepaßter und geformter Gefrierplatten prädestinieren die Sprühmethode zur Cryochirurgie ausgedehnter, großer Tumoren, begünstigt noch durch den Vorteil, daß die operative Verbreitung von Tumorzellen entfällt! - Da Stickstoff ein chemisch inertes Gas ist, treten bei Verdampfen des flüssigen Mediums keine Nebenwirkungen außer Kälte auf. Störend fand ich , daß der aufgespritzte Stickstoff von -196°C auf Grund des großen Temperaturunterschiedes von über 200°C zum Fleischstück gleichsam wie Wasser auf einer heißen Ofenplatte zischend in größerem Umkreis zersprüht. Ich versuchte deshalb durch Schutzzyylinder oder isolierende Abdecktücher angrenzendes Gewebe vor den unerwünschten, multiplen kleinen Kälteläsionen der versprühten Tropfen zu schützen.

c) Bakteriologie

Die zuerst gehegten Bedenken über eine mögliche Keimhaltigkeit des flüssigen Stickstoffs veranlaßten mich zu einer orientierenden Untersuchung, deren Durchführung wir Herrn Dr. KLATTE von der Bakteriologischen Untersuchungsanstalt Erlangen verdanken:

Unter sterilen Kautelen wurden jeweils bis 1 ml flüssiger Stickstoff entnommen und auf sechs Leberbouillon-Kulturen, sowie auf zwei Blutplatten und eine Endoplatte gebracht. Auf einer der beiden Blutplatten wuchsen nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C zwei gelbe und eine weißliche Kolonie. Ein Röhrchen mit Leberbouillon war getrübt. Im Präparat ergaben sich grampositive Kokken. Insgesamt ließen sich in den ca. 9 ml geprüften, flüssigen Stickstoffs mindestens zwei Keime *Staphylococcus albus* und zwei Keime *Sarzina lutea* nachweisen.

Bei der erforderlichen Beimpfungstechnik ist eine sekundäre Verunreinigung durch Keime aus der Luft stets möglich. Aus der Untersuchung kann informativ geschlossen werden, daß der geprüfte Stickstoff keine pathogenen Keime enthielt und der Keimgehalt, falls überhaupt aus dem Stickstoff stammend, sehr gering war.

Dieses Ergebnis trifft wahrscheinlich zu, da Verflüssigungsmaschinen gefilterte, staubfreie Luft ansaugen. Falls völlige Keimfreiheit klinisch notwendig werden sollte, denkbar weil in flüssiger Luft vor allem Sporen und Viren überleben könnten, müßten wir die Sterilfiltration durch Membranen, wie das Seitzsche Filter, anstreben.

II. TIERVERSUCHE

Nachdem die vorausgegangene Abhandlung die theoretischen Grundlagen der Kältetherapie des Blasenkrebses darlegte und die Kälteapparatur schilderte, berichte ich jetzt über experimentelle Gefrierläsionen an der gesunden Hundedblase.

1) Versuchsanordnung

An sechs erwachsenen narkotisierten Hunden wurde die Harnblase suprapubisch freigelegt und geöffnet. Eine Gefriersonde setzte briefmarkenartig 2-4 Kälteläsionen, vorzugsweise über einem oder beiden Ostien, auch an der Hinterwand oder am Blasenscheitel. Anschließend schichtweiser Wundverschluß und Katheterdrainage der Blase.

2) Apparatur

Eine geschlossene, vakuumisolierte Sonde leitet mit Gasdruck im Gegenstromprinzip flüssigen Stickstoff, der durch Verdampfen eine silberne Gefrierplatte von 18 mm Durchmesser auf -196°C kühlt (siehe Seite 40 bis 51).

3) Operative, röntgenologische und pathologisch-anatomische Daten

Hund I, ♀, 9.11.66, Narkose: Trapanal i.v. Suprapubische Cystotomie. Zusätzlich wird die Blasen hinterwand intraperitoneal mit einem Leinentuch gegen anliegende Dünn-

darmschlingen abgedeckt, um sie dem Einfluß der Kälte zu entziehen. Setzen der 1. Gefrierläsion in der Mitte des Blasenscheitels. Zeitdauer des Gefrierens 45 sec. Größe der Gefriermarke $1,5 \text{ cm}^2$, Sondenquerschnitt $1,2 \text{ cm}$. Temperatur unbekannt, schätzungsweise unter -100°C . Die Kältesonde wurde jeweils erst aufgesetzt, nachdem ein feiner Nebel von flüssigem Stickstoff pfeifend im Rückstromrohr austrat. Sie blieb an der Stelle festgefroren und ließ sich ohne zusätzliche Erwärmung erst nach 4 min abheben.

Versuchsziel: Prüfung auf Verklebung mit Darmschlingen und Perforation, da diese Gefahren im dünnwandigen Blasenscheitel naheliegen.

Ort der 2. Gefrierläsion: Links unter der 1., jedoch deutlich davon abgesetzt, an der hinteren Blasenwand. Gefrierdauer 75 sec. Ablösen der Sonde durch Diathermie. Die Gefriermarke erreichte fast 2 cm^2 , sah weiß aus und fühlte sich hart an. Die Blasenwand war sicher durchgefroren, denn das Abstopftuch war mitvereist.

Ort der 3. Gefrierläsion: Rechts unter der 1., Gefrierdauer 80 sec. Größe fast 2 cm^2 . Die Sonde wurde durch Spülen mit steriler, warmer Kochsalzlösung beschleunigt abgelöst.

Ort der 4. Gefrierläsion: Linkes Ureterostium. Gefrierdauer 120 sec. Größe fast 2 cm^2 .

Versuchsziel: Prüfung auf Abflußbeeinträchtigung des Harns.

Schichtweiser Wundverschluß. Drainage des Cavum petzili.

Einnähen eines Blasenkateters in Vestibulum vaginale.

11.11.66. Läuft frei herum und frist. Reaktionen gut.

17.11.66. Ausscheidungsmessung (AUP 23 ml Urin bei
Spannung 60 kv, Abstand 1 m, Belichtungszeit 1''
bei roten Verstärkerfolien): Nach 5, 10 und
15' beiderseits normale Verhältnisse, ebenso
am 12.12.1966.

12.12.66. Obduktion: Das Tier wird durch eine Über-
dosis an Trapanal und Lystenon getötet.

Atemlähmung, Herztillstand.

Befund: Beide Nieren haben gleiche Größe.

Die Faserkapsel ist normal rotbraun gefärbt.

Keinerlei Rückstauung auf der linken Seite,

dessen Ostium vereist war. Beide Harnleiter

sind zart, nicht dilatiert. An der Vorder-

wand der Blase eine reaktionslose Operations-

narbe. An der Hinterwand sind drei derbere

Stellen zu tasten, welche den Gefriermarken

entsprechen. Sie sind von abdominal her mit

Mesenterium der Dünndarmschlingen verwachsen.-

Innere und äußere Fixation des gesamten Uro-
genitaltraktes mit Formalin.

Hund II, ♀, 9.11.66. Gleiche Operationstechnik wie bei Tier I.

Ort der 1. Gefrierläsion: Im Trigonum zwischen beiden Ostien.

Versuchsziel: Prüfung auf narbige Verziehung der angrenzenden Ostien und Behinderung des Harnstroms.

Gefrierdauer 165 sec. Gefriermarke $1,5 \text{ cm}^2$. Die Blasenwand wurde wahrscheinlich nicht komplett durchgefroren.

Ort der 2. Vereisung: Oberhalb des linken Blasenpfeilers.

Gefrierdauer 105 sec. Größe 2 cm^2 . Wand durchgefroren.

Versuchsziel: Prüfung der örtlichen Gefäßreaktion.

Ort der 3. Vereisung: Über dem rechten Blasenpfeiler.

Gefrierdauer 80 sec, Größe ca. 2 cm^2 . Die Blasenwand wurde völlig durchgefroren.

10.11.66. Blutig tingierter Spontanharn.

17.11.66. AUR: Beiderseits normaler Harntransport.

13.12.66. Erneute 2.Operation nach 34 Tagen .

Nach Eröffnung der Blase bietet sich folgendes Bild: Das Blaseninnere hat normale Farbe und normales Faltenrelief. Betasten der derben Konsistenz der Cryonekrose lokalisiert mit Mühe die völlig abgeheilten Stellen. Die regenerierten Areale überzieht ein makelloses Übergangsepithel, das infolge des darunter befindlichen Narbengewebes leicht aufgeheilt oder anämisch aussieht. Vereisung beider Ostien unter Verwendung einer verbesserten Apparatur

mit einer Gefrierplatte von 2 cm^2 .

Größe der Gefriermarken $2,5\text{ cm}^2$.

Gefrierdauer 50 sec.

16.12.66 AUR: Nach 4,8 und 15 min auf der linken Seite normaler Harntransport, keinerlei Stauung. Geringe Stauung auf der rechten Seite. Terminaler Harnleiterabschnitt etwas gekurvt (Abb.10).

19.12.66 Das Tier wird wegen stärkerer Wundinfektion und schlechten Allgemeinzustands getötet.

Obduktion: Beide Nieren völlig normal.

Beide Harnleiter ohne Schlängelung und

Dilatation. Blase: Massive hämorrhagische

Cystitis, abgeschwächt im Bereich der Ge-

frierläsionen des ersten Versuches. Über

beiden Ostien pfenniggroße fibrinöse Krusten

mit glasiggelber Oberfläche, darunter durch-

scheinend ein bräunlich coaguliertes Gewebe.

Fixation in Formalin zur histologischen Untersuchung.

Hund III, ♂, 15.11.1966. Suprapubische Cystotomie.

Ort der 1. Gefrierläsion: Mitte des Blasenscheitels.
Gefrierdauer 120 sec. Größe fast $2,5 \text{ cm}^2$. Anschließend wird das gefrorene Areal im Gesunden excidiert und in 10%igem Formalinspiritus fixiert.

Versuchsziel: Prüfung auf histologische Unterschiede zwischen gefrorenem und normalem Gewebe vor dem Eintritt der Coagulationsnekrose, wichtig zu wissen, weil die tiefgefrorene Blasenwand nach zehnminütigem Auftauen sich makroskopisch nicht von der normalen unterscheidet.

Ort der 2. Gefrierläsion: Mitte der Blasenvorderwand.
Gefrierdauer 180 sec. Größe ca. 3 cm^2 .

22.11.66. Der Hund befindet sich in einem schlechten Allgemeinzustand. Die Operationswunde klafft und ist infiziert. Das Tier hat die Fäden mit den Zähnen herausgebissen.

24.11.66. Obduktion: Die Blase war nur einschichtig vernäht. Die Naht ist insuffizient. In der Mitte der Vorderwand der Blase befindet sich eine Nekrosefläche von $2,5 \text{ cm}^2$. Sie ist gelb, glatt, scharf begrenzt, weist eine fast doppelte Wandstärke auf und ist derb konsistent. An den Schnittflächen durch die Nekrose fällt neben der gelben coagulierten Masse in der Mitte eine blasse rotbräunliche Streifung auf, welche der Muscularis entspricht. Nieren und

Hund IV. ♀, 22.11.66. Vereisung beider Ureterostien.

Gefrierdauer bei vollständiger Penetration der Blasenwand 40 sec. Mit Hilfe eines Cu-Konstanten-Thermoelementes wird an der Serosa-Fläche der Blasen hinterwand eine Temperatur unter -110°C gemessen. Homogene Nucleation ist mithin anzunehmen.

Versuchsziel: Prüfung auf Obstruktion oder Constriktion der Pars intramuralis der Harnleiter

- a) nach Eintritt der frischen Coagulationsnekrose
- b) im Verlaufe der Regeneration durch Fibrosierung und Calcifizierung.

Weitere Fragen, falls cryonekrotische Ostien ein Abflußhindernis bilden sollten:

- c) Wie rasch setzt die Dilatation der Harnleiter ein?
- d) Kommt es zur Hydronephrotisierung?

2.12.66. AUR: Nach 4,8 und 15 min beiderseits geringe Dilatation der Harnleiter, d.h. keine Spindelung.

9.12.66. AUR: Beiderseits normale Verhältnisse, ebenso am 12.1.1967 und am 16.2.1967, d.h. nach 86 Tagen (Abb.10 und 11).

Obduktion: Normale Nieren. Harnleiter nicht dilatiert. Die Blase zeigt an ihrer Vorderfläche stark hervortretende geschlängelte Venen, Einflußstauung durch Cryonekrose von Teilen des Paracysticus mit ableitenden Venen des Plexus venosus vesicalis.

Innere und äußere Fixation des Urogenitaltraktes mit Formalin.

Hund V, ♀, 29.11.66. Setzen von drei zusammenhängenden Gefriermarken über beiden Ureterostien und paraosteal über dem Trigonum.

Versuchsziel: Untersuchung auf Abflußbehinderung, Ausmaß eines eventuellen Rückstaus und Toleranz einer großflächigen Vereisung.

Gefrierdauer je 45 sec, bei voller Penetration der Blasenwand. Größe der Gefriermarken je $2,5 \text{ cm}^2$. Größe des zusammenhängenden gefrorenen Areals $3 \times 3 \text{ cm}$.

2.12.66. AUR nach 3 Tagen als Funktionskontrolle in der Phase der Coagulation. Die Bilder nach 4,8 und 15 min zeigen auf der linken Seite eine minimale Einflußstauung, nur daran kenntlich, daß die physiologische Spindlung des linken Harnleiters fehlt. Rechts völlig normale Verhältnisse.

9.12.66. AUR nach 10 Tagen zur Funktionskontrolle in der Phase der verflüssigenden Nekrose: Völlig normale Verhältnisse.

20.12.66. AUR nach 21 Tagen zur Funktionskontrolle in der Phase der Regeneration: Völlig normale Verhältnisse.

12. 1.67. AUR nach 44 Tagen, Spätergebnis: Beiderseits keinerlei Harnstauung. Kontrastmittelallergie. Atemlähmung, Herzstillstand.
Obduktion: Beide Nieren haben normale Größe. Kleine käsige Tüpfel sind über die Kapsel verstreut. Beide Harnleiter sind schlank, zart, ohne jede Dilatation. Blase von außen unauffällig.
Fixation des Harntraktes in Formalin.

Hund VI, ♀, 6.12.66. Setzen von drei zusammenhängenden Gefriermarken über beiden Harnleitermündungen und paraoesteal über dem Trigonum.

Gefrierdauer je 50 sec bei voller Penetration der Blasenwand. Größe der Gefriermarken je $2,5 \text{ cm}^2$. Konzept wie bei Versuchtier V.

9.12.66. AUR nach 3 Tagen: Rechts völlig normal, links terminaler Harnleiterabschnitt gering gekurvt als Zeichen einer Einflußstauung.

16.12.66. AUR nach 10 Tagen: Beiderseits mittelgradige Harnstauung.

13. 1.67. AUR nach 73 Tagen: Rechts völlig normal, links urographisch fast komplett stumm.

Obduktion: Der rechts Harnleiter und die rechte Niere sind unauffällig. Die linke Niere ist blaß und deutlich vergrößert. Das Nierenbecken ist ausgeweitet, das Parenchym auf die Hälfte reduziert und eitrig entzündet. Der linke Harnleiter ist in Schlingen gewunden und grob auf das fünffache dilatiert. Seine Wand ist stark verdickt. Terminal hochgradige Harnleitermündungsstenose. Die Blase ist an dieser Stelle von derber Konsistenz, verdickt und verzogen. Wegen des abweichenden, konträren Befundes wird der genaue pathohistologische Bericht wiedergegeben:

In Schnitten aus dem linken Ostium erkennt man einen massiven, in narbiger Abheilung begriffenen

Entzündungsprozeß. Der Narbenbereich erfaßt alle Blasenwandschichten und zeigt abschnittsweise eine phlegmonöse leukocytäre Infiltration. Daneben finden sich Rundzellinfiltrate, meist als Lymphfollikel ausgeprägt. An den Gefäßen des Narbenbereichs finden sich Zeichen einer abgelaufenen symptomatischen Endangitis mit zum Teil weitgehender Obliteration der Lichtung. Ursache des Prozesses ist Nahtmaterial in der Blasenwand, das in der Nähe des intramuralen Ureteranteils placiert wurde.

Die schwere Entzündung, die ausnahmsweise einen Ureterverschluß mit Entwicklung einer Pyonephrose zur Folge hatte, ist also nicht in der Vereisung, sondern in der Fadeneiterung zu erblicken.

PATHOHISTOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN UND MAKROSKOPISCHE BEFUNDE

bei Einwirkung tiefster Temperaturen auf die Blasenwand.

I. STADIUM DER SOFORTIGEN CRYONEKROSE

1) Der Gefriervorgang

Nach Aufsetzen einer Kältesonde von -196°C breitet sich auf der Schleimhaut in Sekundenschnelle ein bleiches, gefrorenes Areal um deren Spitze aus, welches konzentrisch wächst und nach ungefähr 1 min an der adventitiellen Seite der Blasenwand erscheint. Der unter der festgefrorenen Sonden- spitze sphärisch oder elliptisch solide vereiste Gewebsballen ist in seiner Größe von der Einwirkungsdauer abhängig; jedoch der Zeitbedarf steigt wegen Isolation bei Zunahme von Fläche und Gewebs- tiefe beträchtlich an. Als durchschnittliche Ein- wirkungsdauer wurden in Tierversuchen 1 bis 3 min gewählt.

Der Frostwall breitet sich durch alle Schichten aus und bedingt HÄMOSTASE. Die Blutsäule in den Gefäßen steht augenblicklich und erstarrt zu Eis.

Kleine freie Nervenendigungen, die im Dienste der Schmerz- rezeption stehen, werden zerstört, so daß der Gefrier- schritt gleichzeitig anästhesierend wirkt.

Hierzu möchte ich A.U. Smith zitieren(10, S.441):

"Das Abtöten von Nervenzellen, Nervenfasern und Ganglien konnte bei Kühlung auf -79°C in keinem Fall verhindert werden."

2) Die Auftauphase (etwa 15 min lang)

Das Auftauen vollzieht sich infolge der unterbrochenen Durchblutung sehr langsam in 10 bis 15 min durch Erwärmung vom Rande her oder durch anliegende Gewebsteile. In dieser Phase vollendet sich der cryonekrotische Effekt durch wandernde Rekristallisationszonen, die in ihrer Wirkung einer mehrfachen Wiederholung des Frostens gleichkommen und bei Temperaturen über -80°C an Häufigkeit zunehmen. Kleine Eiskristalle werden dabei zu großen, traumatisierenden umgruppiert (nach Rey L.R.,19).

Die wichtigsten lethalen, zellulären Veränderungen der Cryonekrose sind:

- a) Ruptur der Zellmembranen,
des endoplasmatischen Retikulums
einschließlich
der doppelmembranigen Mitochondrien vom
cristären Typ und
der Kernmembran (nach Armstrong, siehe S.31)
- b) Zerstörung des Chromatingerüsts mit späterer
Bildung von Kerndetritus.
- c) Denaturierung von Zellproteinen (siehe S. 32)
Diese Mikroläsionen der Zellen bleiben den
üblichen lichtmikroskopischen Untersuchungsmetho-
den verborgen, bis sich nach Stunden die Zei-
chen einer zunehmenden parenchymalen Degenera-
tion als Folgen einstellen. Auch makroskopisch
sehen die aufgetauten cryonekrotischen Gewebe-
schichten vorerst weitgehend unverändert aus.
Erst in den folgenden Stunden stellen sich Ver-

änderungen ein, die weitgehend denen einer trüben Schwellung entsprechen und in fließendem Übergang zur Coagulationsnekrose führen. Die Zellstrukturen weisen zunehmend schattenhafte Formationen und Umrisse auf.

- d) Alle zellulären Elemente werden zerstört, während das elastische und kollagene Bindegewebe devitalisiert, in seiner Struktur jedoch erhalten bleibt (27, 28).
- e) Das im Gefäßbaum stehende Blut verfällt der Kälteerythrolyse.

II. DIE KONGESTIONSPHASE UND DIE KOAGULATIONSNEKROSE

Nach dem Auftauen der gefrorenen Blasenwand quillt das Gewebe und an der zerstörten Schleimhautschicht wird ein durch gelöstes Hämoglobin verfärbter Fibrin-film ausgeschwitzt, so daß die cryonekrotischen Übergangszellen miteinander verbacken und einen Überzug aus gelähnlichen, koagulierten, schmalen Platten bilden.

Durch die Schädigung der Gefäßwände kommt es zur **EXTRAVASATION** des Blutes, der hämorrhagischen Durchtränkung aller Gewebsschichten, wobei sich vereinzelt ödematöse und hämorrhagische Blasen bilden, welche die Mucosa stellenweise etwas abheben.

Der Austritt von Plasma und Hämoglobin wird durch die nach mehreren Stunden einsetzende Koagulation abgelöst infolge der reichlich zerfallenen Thrombocyten und freigesetzten Ca-Ionen. Dies bedeutet, daß die Cryonekrose dem Typus der Koagulationsnekrose angehört, deren volles Bild sich innerhalb von 24 h ausprägt.

Durch koagulative Obliteration werden weitgehend alle zellulären Strukturen verwischt und ausgelöscht, so daß nur noch deren schattenhafte Umrisse erkennbar sind. Verstärkt wird dieses Bild durch die Hämorrhagie gezeichnet, die vom Rande aus unterhalten wird.

Zudem unterscheidet sich die Cryonekrose durch DISINTEGRATION der Gewebs- und Tumorzellen (30), einem Auseinanderweichen der zerstörten Zellen, verbunden mit der Bildung eines Koagulums, in dem intakte und aufgelöste rote Blutkörperchen breit verteilt sind. Letztere können als hämoperitonische Ablagerungen über Wochen in Biopsien verfolgt werden (Gonder a.a.,31).

An der peritonealen Oberfläche sickert eine eiweißreiche Flüssigkeit aus, bzw. erfüllt sie das perivesicale Fettgewebe. Mc Donald (26) spricht von einem entzündlichen Exsudat, wahrscheinlich ist es aber eine rein seröse Entzündung (nach der Definition in der Interzellularpathologie von Eppinger) oder einfacher ausgedrückt: ein Plasmaaustritt, der zu Adhäsionen führen kann.

Nach großflächiger Vereisung von Hundblasen sahen wir mehrfach an den aufgetauten Gefriermarken ein Quellen des Gewebes und ein leichtes Sickern von kälteerythrolysiertem Blut, das auf der Schleimhaut einen filmartigen Belag bildete. Dazu der histologische Beleg (Hund III):

In dem vereisten Stück der Blasenwand finden sich vor allem in der Submucosa strotzend mit Blut gefüllte Capillaren und ausgedehnte Blutaustritte ins Gewebe, die in den zentralen Anteilen vorwiegend als Extravasation von Blutplasma imponieren. In den dilatierten (starr gelähmten) Capillaren läßt sich ein Strom von Leukocyten mit Zeichen der Leukodiapedese beobachten. Die Muscularis weist keine Veränderungen ihrer Struktur auf.

Pathophysiologisch lassen sich diese histologischen Befunde aus der Kongestionsphase bewerten:

Der Gefrierprozeß lähmt die Gefäße und Capillaren irreversibel, der Tonusverlust dilatiert sie, und macht sie durchlässig. Die Folgen sind Plasmaaustritte von kälteerythrolysiertem Blut der hämostatischen Phase und Blutastritte durch hämorrhagischen Andrang vom Rande her.

Kennzeichnend für diese Phase ist die Quellung des zerstörten, denaturierten Gewebes: das

Gefrierödem.

Es bildet sich bei Einfrieren der Ureterostien als lokales Ödem der pars intramuralis aus, das zur Dilatation des distalen Ureterabschnitts führt. Diese Er-

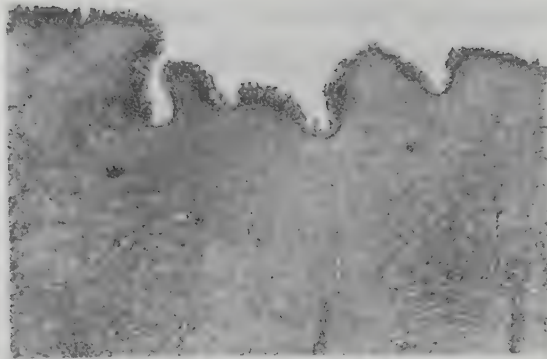


Abb.3. Hund IV, Blasenwand aus dem Trigonum vesicae, 86 Tage nach Vereisung, Färbung nach van Gieson. Narbenfibrose der Blasenwand mit völligem Untergang der Muskelbündel und Neubildung eines diffusen Muskelfasernetzes. Flaches Faltenrelief und vollständig regeneriertes Übergangsepithel mit bandförmiger subepithelialer Leucocyteninfiltration als Ausdruck einer Cystitis.

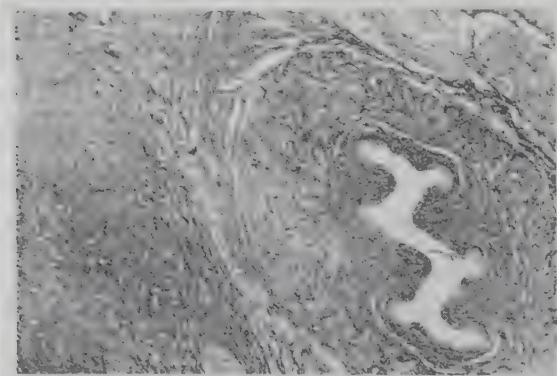


Abb.4. Hund IV, rechtes Ostium, 86 Tage nach Vereisung, van Gieson. Reizlose kollagene Narbenfibrose mit diffuser Neubildung glatter Muskelfasern und Regeneration einzelner erhalten gebliebener Muskelbündel. Die intramurale Ureterlichtung ist von einem makellosem Übergangsepithel ausgekleidet und nicht eingengt.

scheinung ist reversibel, da sich das Gefrier-
ödem mit seinen Folgen innerhalb von 3 Wochen
völlig zurückbildet (Abb.9-11).

Nach eingetretener Koagulationsnekrose scheint
die Umwandlungszone kleiner als die Gefriermarke
zum Zeitpunkt der Vereisung. Die Nekrose sieht
intensiv gelbbraunlich aus und besitzt eine feste,
derbe Konsistenz.

III. KÄLTETHROMBOSIERUNG DER GEFÄSSE

Blutgerinnung in einem Gefäßlumen hat drei bekannte
Voraussetzungen:

- 1) Änderung der Beschaffenheit des Blutes.
- 2) Die Schädigung der Gefäßwand.
- 3) Verlangsamung der Blutströmung (Stase).

ad 1) Die membranzerstörende Wirkung der homogenen
Nucleation [22]bedingt nicht nur Kälteerythrolyse,
sondern auch den Zerfall der Thrombocyten, die
bereits auf geringe Änderung der Oberflächenspan-
nung empfindlich reagieren. Weiter verändert die
homogene Nucleation das Verhältnis von Calcium-
zu Natrium- und Kaliumionen(nach Finn und
Lowlock, siehe S. 33)Nur durch Mitwirkung der Ca-
Ionen verwandeln aktive Thromokinase, Acclerin
und Convertin das Prothrombin in Thrombin.

Mit diesen Argumenten ist der gerinnungsfördernde Einfluß des Gefrierens keineswegs geklärt. Selbst widersprechende theoretische Aussagen bieten sich an. Bekannte intravasale Hemmfaktoren, wie die Antithrombine bestehen aus Lecithinen, die gerade durch toxische Elektrolytkonzentrationen selektiv aus Membranen gelöst werden.

Unter den Trennungsverfahren der Eiweißkörper kennen wir das Aussalzen, wobei die Globuline vor den Albuminen ausfallen. In welchem Maße durch Gefrieren Fibrinogen, Prothrombin und Plasmafaktoren denaturiert werden, ist noch nicht bekannt.

- ad 2) Verschiedene Autoren erwähnen [3,4], daß nach Gefrieren die Intima wie bei Röntgenbestrahlung quillt und Abscheidungsthromben die Gefäße einengen und verstopfen. Cryonekrose der Intimazellen setzt vielleicht Gewebsthrombokinase frei, welche die Gerinnung einleitet und ein Polster aus Fibrin, agglutinierten Blutplättchen und vereinzelter Leukocyten entstehen läßt.
- ad 3) Die minutenlange komplette Hämostase in gefrorenem Gewebe induziert nicht allein Stagnationsthromben. Von Bedeutung dürfte auch die irreversible Gefäßlähmung sein, welche die Stase nach dem Auftauen unterhält.

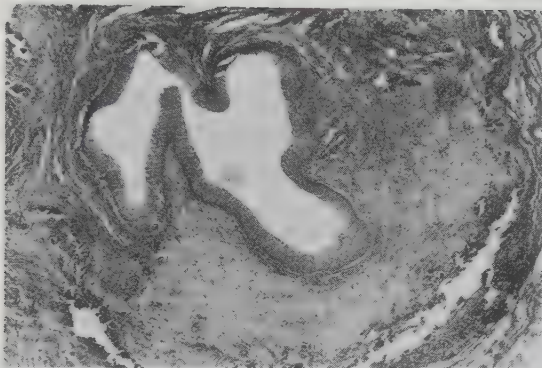


Abb.5. Hund V, linkes Ostium, 44 Tage nach Vereisung. Die offene Lichtung des intramural verlaufenden Ureters wird von einem hohen Übergangsepithel umsäumt und von einem Polster der durch Schwielengewebe ersetzten Uretermuskulatur umgeben. In den äußeren Wandschichten sind nekrotische Muskelfasern schalenförmig verkalkt; zum Teil sind die Kalkschollen herausgefallen.

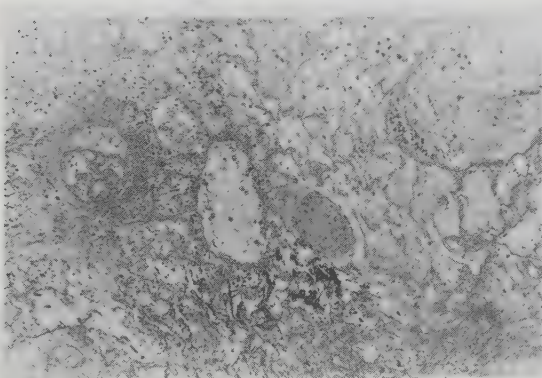


Abb.6. Hund III, Ausschnitt aus der Cryonekrose der Blasenwand nach 9 Tagen. Neben der homogenisierten Wandstruktur mit Leucocyteninfiltration sieht man in dem in der Bildmitte liegenden Gefäß einen hyalinen Thrombus.

Im folgenden wird versucht, histologisch zu entscheiden, ob es Abscheidungs- oder Gerinnungsthromben sind, welche Blutgefäße nach tiefem Gefrieren verstopfen. Dabei gilt es zu erwägen, ob sich neben roten Thromben mit Zahnscher Riffelung auch weiße oder "hyaline" Thromben in den Capillaren bilden.

Histologischer Befund (Hund III).

In Schnitten einer bereits eingetretenen Coagulationsnekrose durch Gefrieren finden sich in den Gefäßen hyaline Thromben, also der Typus der Abscheidungsthrombose (Abb.6).

IV. STADIUM DER VERFLÜSSIGENDEN NEKROSE (Dauer etwa 10 Tage)

Mit der Kongestion setzt eine Invasion von Granulocyten in das cryonekrotische Gewebsareal ein, welche durch ihre enzymatische Tätigkeit das zerstörte Zellmaterial einschmelzen und resorbierbar machen. Möglicherweise spielt in diesem Geschehen ebenfalls die Autolysis durch dissoziierte, vorher membranorientierte Enzymsysteme eine dominante Rolle.

Diese späte Phase der Kältenekrose führt die REGRESSION und Einschmelzung des abgestorbenen Gewebes herbei. In diesem Stadium beobachten wir eine gesteigerte Histiocytentätigkeit, die ihren

Ursprung von intakten Retikuloendothelien und Adventitia des Randes nimmt, und eine gesteigerte Leukocyteninfiltration.

L.W.Smith (3) beschrieb die Erscheinung der Regression der Tumorzellen, wie ich sie sinngemäß darstelle:

- a) Granuläre, wässrige und fettige degenerative Veränderungen erfassen das Cytoplasma in Graduierungen, die von histologischem Aufbau und Abkunft der Zellen abhängen.
(Feintropfige Entmischung!)
- b) Die Kern-Plasma-Relation ist verzerrt.
- c) Häufig können pyknotische Schrumpfungen der Zellkerne beobachtet werden, gelegentlich auch karyolytische Schwellungen, die in einer Ruptur der Kernmembran enden.
- d) Je undifferenzierter Tumorzellen sind, vor allem wenn sie der epithelialen Reihe angehören, umso schneller treten regressive Erscheinungen auf.

V. STADIUM DER BEGINNENDEN REGENERATION

zum Zeitpunkt der akuten Läsion: (1 Woche nach dem Gefrieren)

Bereits L.W.Smith (3) betonte in seiner Arbeit über die pathologischen Veränderungen von Geweben bei Kälteeinwirkung (1940), daß die Abheilung erheblich ulcerierter Oberflächen gleichzeitig mit

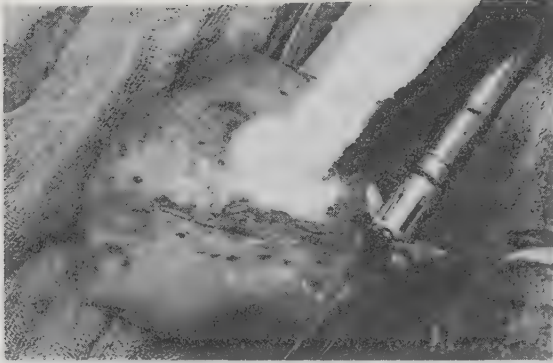


Abb.7. Setzen einer Gefrierläsion über dem linken Ostium im Blasendreieck (Hund VI) mit einer Gefriersonde. Über den Rand der Gefrierplatte wächst konzentrisch ein weißer Frostwall, der nach 50sec die Blasenwand völlig penetriert.

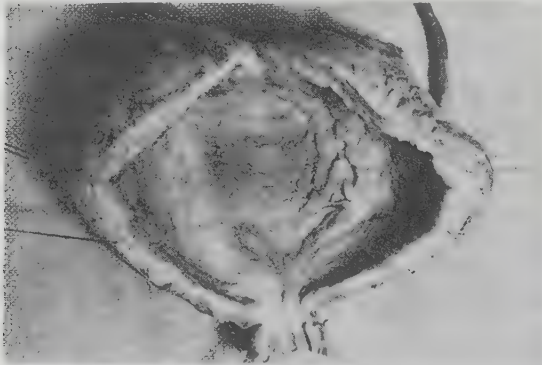


Abb.8. Abgeheilte Cryonekrosen über beiden Ostien nach 86 Tagen (Hund IV). Trotz der interstitiellen Fibrose findet sich beidseitig eine plica ureterica mit einem gut erkennbaren und sondierbaren Ostium ureteris. Die Schleimhaut hat sich makellos regeneriert und ihre Faltenstruktur wiedergewonnen.

der Regression des Tumors fortschreitet. Neben Abbau und Einschmelzung setzen frühzeitig Aufbauvorgänge ein, die sich als bindegewebige Organisation der serös durchtränkten, koagulierten Nekrose äußern. Nach einer Woche tritt eine deutliche Fibroblastentätigkeit am Rande der Verletzung auf (nach Gonder u.a.,[31]), welche auf die völlig zerstörte glatte Muskelschicht übergreift und sowohl Submucosa als auch Adventitia erfaßt. Diese interstitielle Fibrose nimmt eindeutig ihren Ursprung von intakten Randpartien der Muscularis, die somit als Leitgewebe der bindegewebigen Proliferation angesehen wird. Als Begleiterscheinung der mesenchymalen Reaktion finden sich Lymphocyten und Plasmazellen.

Selbst ein der peritonealen Oberfläche des Blasenscheitels aufgelagertes, entzündliches Exsudat wird organisiert.

Von Mc Donald (26)angestellte Serienschnitte durch die pars intramuralis ureteris liefern keine Zeichen einer Obstruktion. Das Übergangsepithel des Ureters regeneriert sich und die umgebenden Strukturen sind bis auf eine gut erkennbare Proliferation von Fibroblasten ausgelöscht.

Bei makroskopischer Befunderhebung nach 7 Tagen zeigt sich in der Blase eine nekrotische Membran, welche die Stellen der Gefrierläsion bedeckt. Der durch das lokale Gefrierödem abflußbehinderte Ureter enthüllt eine leichte Dilatation.

Den bereits beschriebenen Verlauf der Gewebeseinschmelzung und Abheilung belegen wir mit pathohistologischen Befunden aus der Phase der verflüssigenden Nekrose und beginnenden Regeneration nach 9 Tagen (Hund III, Corpusbereich):

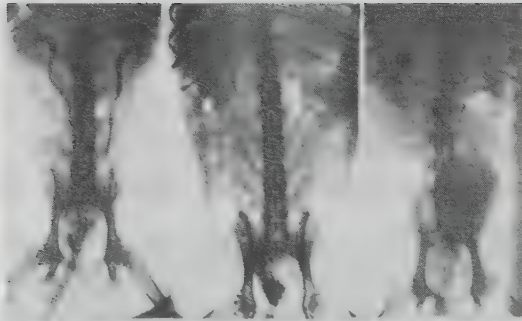


Abb.9

Abb.10

Abb.11

Abb.9. Hund II, AUR nach 15', 3Tage nach Cryonekrose beider Ostien. Beide Harnleiter terminal bogenförmig verlängert. Keine Dilatation des Nierenhohlsystems.

Abb.10. Hund IV, AUR nach 4', 10 Tage nach Cryonekrose beider Ostien. Beide Harnleiter gering terminal stenosierte.

Abb.11. Hund IV, AUR nach 4', 12 Wochen nach Cryonekrose beider Ostien. Normale Uro- und Nephrographie.

Die Totalnekrose begrenzt ein breiter Leukocyten-wall. Die Muscularis zeigt eine völlig geschwundene Kernfärbung und scholligen Zerfall. Das Interstitium ist hochgradig durch Quellung verbreitert bei gut erkennbarer Kollagenstruktur. Unmittelbar benachbart findet sich eine schmale "Verwischungszone", die auf den leukocyitären Demarkationswall folgt. Sie bietet das Bild eines entzündlichen Granulationsgewebes mit lebhafter Proliferation mesenchymaler Zellen, verbunden mit der Neubildung von Capillaren. Neben dem weitgehenden Untergang der Struktur der Blasenwand werden Reste der Muscularis durch Leukocyten abgebaut und durch zellreiches Bindegewebe ersetzt (Abb. 6).

VI. DAS STADIUM DER ABHEILUNG UND VERNARBUNG

(nach 1 bis 3 Monaten)

Regeneration nach 34 Tagen: (Hund II, paraosteal im Blasenfundus)
Im Blaseninnern findet sich paraosteal eine nivellierte, vollständige Schleimhautoberfläche ohne die faltige Struktur des angrenzenden Epithels, offenbar als Ausdruck der durch Narbenbildung bedingten Wandstarre. Die vereiste Stelle charakterisiert ein weniger zell- als faserreiches Bindegewebe, eine Zwischenstufe von Granulations- und Narbengewebe.

Abheilung nach 44 Tagen: (Hund V, beide Ostien paraosteal)
(Abb.5)

In Schnitten aus dem Bereich der beiden Ostien ist die Faltenstruktur der Schleimhaut im Vereisungsbereich wieder nachweisbar, wenngleich sie flacher ausfällt. Von der Mucosa bis in das perivesicale Gewebe erstreckt sich ein einheitliches, faserreiches Narbengewebe, das in Zügen fächerförmig in die seitlich angrenzende Muscularis einstrahlt.

Besonderheit eines Spätergebnisses nach 86 Tagen:
(Hund IV, beide Ostien, Abb.4,8).

In Stufenschnitten aus dem gefrorenen linken Ostium finden sich eine Fibrose der Blasenschleimhaut mit bandförmiger Infiltration von Leukocyten, Lymphocyten, Plasmazellen und strotzend mit Blut gefüllte, erweiterte Schleimhautcapillaren. Diese Erscheinungen sind deutliche Zeichen einer chronischen Cystitis, die im selben Grade an anderen, nicht vereisten Stellen der Blase ausgeprägt ist.

Als einmaliges Beispiel in unseren Versuchen beobachteten wir eine knöcherne Metaplasie des Schleimhautstromas
(Hund IV):

Unter dem abgeflachten Übergangsepithel liegt ein Herd aus regelrecht strukturiertem, spongiösem Knochen, dessen Markräume fibrös ausgefüllt sind. Den Spongiosabälkchen sitzen dichte Osteoblastensäume auf.

Weitere Schilderung von Spätergebnissen:
(Hund IV , V, VI).

Im Zentrum der Gefrierläsion erfaßt die Narbenbildung alle Wandschichten. Im Bereich der Ureterostien ist die Fibrosierung deutlicher auf die Innenschicht der Muskulatur beschränkt. Als morphologische Besonderheit der Vernarbung der Blasenmuskulatur in diesen Arealen bietet sich, vielleicht infolge des funktionellen Reizes, folgendes Bild (Abb.3):

Während im allgemeinen im Narbenbereich erhaltene Muskelbündel und kollagenes Narbengewebe sich klar voneinander abheben, sieht man hier Abschnitte, in denen glatte Muskelfasern und kollagene Fasern sich diffus verflechten und ein dichtes Netzwerk bilden. Die Vermutung drängt sich auf, daß es sich hier nicht um eine Regeneration überlebter Muskulatur handelt, sondern um eine echte Neubildung von Muskelfasern aus dem pluripotenten Mesenchym, etwa analog zur isolierten Knochenbildung in der Schleimhautnarbe (Hund IV).

Komprimiert ergibt das wichtige Kapitel der Regeneration: Binnen ca. eines Monats regeneriert das Übergangsepithel der Blase. Es sieht anfangs nivelliert und faltenarm aus, gewinnt dann zunehmend seine faltige Musterung zurück. Ein ausgedehntes Narbengewebe nimmt Lamina propria und Muscularis langsam ein. Vom Rande erfolgt neben einer unbeträchtlichen Regeneration von Muskelbündeln eine

großzellige Proliferation des Mesenchyms und Capillareinsprossung in die cryonekrotische Blasenwand. Leukocyten bauen im selben Maße gleichzeitig das coagulierte Gewebe ab. Dieser Prozeß von Einschmelzung und bindegewebigem Ersatz dauert ca. 4 Wochen, jedoch dehnt sich der Vorgang der interstitiellen Fibrose bis auf 3 Monate aus und erfährt Modifikationen, wie Calcifizierung und Neubildung von glatten Muskelfasern, ermöglicht von der Pluripotenz des Mesenchyms.

KLINISCHE INTERPRETATION DER EXPERIMENTELLEN BEFUNDE

1) Perforationsgefahr

Unter den insgesamt 18 gesetzten Gefrierläsionen (an 6 Tieren) verteilt über Trigonum, Korpus und Apex, mit einem Durchmesser von 2-4 cm, beobachtete ich keine Perforation. Selbst die im Blasenscheitel gelegenen, vereisten Stellen zeigten in der Phase der verflüssigenden Nekrose keine Neigung zum Durchbrechen.

Als anschaulicher Beweis ein Obduktionsbefund einer 9 Tage alten Cryonekrose (Hund III):

In der Mitte des Blasenscheitels befindet sich eine Nekrosefläche von $2,5 \text{ cm}^2$. Sie ist gelb, glatt, scharf begrenzt, weist fast doppelte Wandstärke auf und besitzt eine derbe Konsistenz. An den Schnittflächen durch die Nekrose fällt neben der gelben, koagulierten Masse in der Mittelschicht eine blasse, rotbräunliche Streifung auf, welche der Muscularis entspricht.

Die histologischen Schnitte zeigen eine Totalnekrose des gesamten, vereisten Bezirkes, einen leukocytären Dermarkationswall, einen vollständigen Schwund der Kernfärbung und scholligen Zerfall der Muskelfasern. Das Interstitium ist hochgradig verbreitert, die Kollagenstruktur gut erkennbar. Am Rande besteht eine bandförmige, leukocytäre Infiltration, verbunden mit Capillarsprossung und großzelligen Mesenchymwucherungen (Abb.6).

2) Die Kältenekrose als zeitlich überbrückender
plastischer Ersatz

Die radikale Excision eines auch nur kleinen Carcinoms an funktionswichtigen Stellen, wie im Trigonum, erhöht die Komplikationsrate. Die Cryonekrose dagegen liefert einen überbrückenden plastischen Ersatz. Sie ist widerstandsfähig gegen die Einwirkung des Harns, fest gegen die mechanische Beanspruchung der Detrusoraktion. Binnen ca. 4 Wochen entsteht das Regenerat, da die ursprüngliche Gewebestruktur durch die nur devitalisierten elastischen und kollagenen Fasern erhalten bleibt und als Leitgewebe zur Abheilung dient.

Hervorzuheben ist noch die Beständigkeit gegen bakterielle Zersetzung. Mehrfach entstanden postoperativ Cystitiden, welche die Regeneration un- erheblich beeinträchtigten. Wie in der unversei- ten Blasenwand fanden sich in den abheilenden Kältenekrosen oberflächlich in der Submucosa ge- legene, bandförmige Leukozyteninfiltration und eine verstärkte Fibrose der Schleimhaut.

3) Obstruktion des Ureters in der Pars intramuralis
und intravesicalis

Nach frischer Cryonekrose der Ostien erhält oder schafft sich der in peristaltischen Spindeln ab- fließende Harn in dem relativ weichen Coagulations-

bett eine normale und nur ausnahmsweise gering beeinträchtigte Kanallichtung, wie die urographischen Kontrollen klar anzeigen (Abb. 9-11). Nach Abheilung der Kältenekrose, hier 33 Tage nach Vereisung des linken Ureterostiums (Hund I): Die Lichtung ist mit Schleimhaut ausgekleidet. Vom intramuralen Anteil des Ureters läßt sich lediglich an der äußeren Circumferenz eine Muscularis abgrenzen, während sie gegen die Blasenlichtung völlig durch faserreiches Bindegewebe ersetzt ist. Die Ureterlichtung ist nicht erkennbar reduziert.

Ergebnis nach 44 Tagen:(Hund V, beide Ostien vereist).

Die Muscularis der Pars intramuralis ist durch Narbengewebe ersetzt. Daneben finden sich besonders in den äußeren Schichten liegendegebliebene nekrotische Muskelbündel, intensiv imprägniert durch Kalksalze, so daß eine mantelförmige Kalkschale die Pars intramuralis des Harnleiters umgibt. Das Lumen ist jedoch nicht erkennbar eingengt, wie auch die Urographie bestätigt (Abb.5)

Ebenso fanden wir keine deutliche Dilatation des Harnleiters in Sektionsbefunden und histologischen Schnitten der Tiere, die wir bis zu 3 Monaten nach dem Setzen von Kältenekrosen über beiden Ostien am Leben ließen.

Gleichermaßen beobachteten wir keine tubuläre Druckatrophie und keine Erweiterung des Nierenhohlsystems, welche wir ursprünglich als Folge einer Constriction oder eines Verschlusses der durchgefrorenen Ureterostien vermutet hatten. Die auf der linken Seite von Hund VI ausgeprägte schwere Pyonephrose ist auf Fadenweiterung zurückzuführen.

4) Ascendierende Pyelonephritis

Da die Versuchstiere postoperativ keine Antibiotica erhielten, stellten sich öfters Cystitiden und Pyelonephritiden ein, teils mit granulierenden Rindenabszessen. Es muß eingeräumt werden, daß eine mögliche temporäre Stase nach Cryotherapie der Ostien bakterielle Ascension begünstigt.

Besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. G.Heller vom Patholog. Institut der Universität Erlangen aussprechen, der bei der mikroskopischen Untersuchung und Beurteilung der Gewebeschnitte half. Sehr wertvoll war mir die Hilfe des Herrn OA.Dr. Schmidt von der Urolog. Abt. der Chirurg. Universitätsklinik bei der Ausführung der Operationen an Hundenblasen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die angestrebte organerhaltende Kältebehandlung des Blasenkrebses setzt Untersuchungen voraus, wie die gesunde Harnblase auf extremes Gefrieren mehr oder minder großer Anteile reagiert.

Modellversuche an 6 Hundeblassen ergaben:

- 1) Die Gefriersonde erzeugt einen Frostbezirk beliebiger Tiefe und Breite.
- 2) Der Frostwall verursacht mit seinem Entstehen Hämostase und Avaskularität. Resektion des erfrorenen Gewebes, falls erwünscht, geschieht daher in Blutleere.
- 3) Die Kälteläsion thrombosiert die Gefäße.
Histologisch konnte der Typus der hyalinen Abscheidungsthrombose nachgewiesen werden.
- 4) Die Kälteläsion setzt gegen Nachblutungen absichernde, tamponierende Coagulationsnekrosen nicht nur beliebig tief und breit, sondern auch untoxisch.
- 5) Kältenekrosen der Harnblase perforieren nicht.
- 6) Kältenekrosen der Harnblase bilden einen überbrückenden plastischen Ersatz, bis die Regeneration stattgefunden hat.
- 7) Die Regeneration benötigt ca. 4 Wochen. Sie setzt sich zusammen aus überwiegender Fibrotisierung des Zwischengewebes, vollständiger Neubildung des Epithels und in geringerem Grad aus

neugebildeter Muskulatur.

- 8) Cryonekrosen der Harnletermündung und der Pars intramuralis des Harnleiters regenerieren auf die gleiche Art durch Fibrotisierung, vereinzelt auch durch Calcifizierung. Das Lumen bleibt offen. Die Transportstörungen des Harnstroms sind geringfügig und temporär.

CRYOTHERAPIE DES HETEROTRANSPLANTIERTEN MENSCHLICHEN
KREBSSES

Da für den Operateur bei Anwendung von Kältetherapie ein besonderes Interesse besteht, ob nach Vereisung eines Malignoms eine sichere Zellzerstörung zu erwarten ist oder eine geringe Zahl von Krebszellen überlebt, die erneut ein invasives Wachstum unterhalten, zielen die weiteren Versuche darauf ab, noch unbekannte oder unsichere Faktoren der Cryotherapie vor klinischer Anwendung in Tierversuchen rascher abzuklären.

Nach den Ausführungen in den theoretischen Grundlagen der Cryotherapie (siehe S.29) genügte zum Nachweis eines sicheren Zelltodes der lichtmikroskopische Nachweis von massiv auftretenden intrazellulären Eiskristallen, die eine homogene Nucleation anzeigen. Nach Brion E. Heard (30) gelingt dies auf folgende Weise:

a) Phasenkontrastmikroskopie eines Gefrierschnitts, dessen Temperatur in gleicher Tiefe gehalten wird.

b) Kältealkoholfixation

Da gefrorenes Gewebe nach dem Auftauen makroskopisch und lichtmikroskopisch unverändert aussieht, muß die Fixation im Gefrierzustand bei möglichst gleicher Temperatur erfolgen.

c) Gefriertrocknung im Hochvakuum

Da Eis, Wasser und Wasserdampf stets in einem Verhältnis fließender Übergänge stehen, ist es möglich, durch Herabsetzen der Sattedampfspannung kontinuierlich nach Art eines Fließgleichgewichtes

Wasser zu entfernen und das Gewebe bei entsprechender Temperatur einzutrocknen.

Im Elektronenmikroskop können selbst nach der Auftauphase in Zellen Gefrierschäden festgestellt werden, wie Verklumpung des Kernchromatins, Zerstörungen und Gasblasenbildung in Membransystemen (22).

Ein direkter Beweis des Zelltodes ist allerdings durch die aufgeführten Methoden nicht zu erbringen. Ihre Aussagekraft muß in parallel laufenden Versuchen durch den histologischen Nachweis eingetretener Nekrosen, ausbleibendes Wachstum in der Gewebekultur oder Transplantationsverfahren erhärtet werden.

1966 veröffentlichten Mc Donald, Mobley und Rudolph (32) ihre Versuche über die Cryotherapie des heterotransplantierten menschlichen Blasenkrebses. Sie führten zu keinen brauchbaren Ergebnissen über sicheres zelltötendes Gefrieren, da die Xenotransplantate trotz Cortisongaben bei 500 mm³ der spontanen Nekrose verfielen und lediglich bei -4°C gefroren wurde.

Ein möglichst adäquater Nachweis vom Überleben einiger Krebszellen nach Cryotherapie ist bisher nur durch die Gewebekultur oder noch **besser** durch heterotransplantierbare Human-Tumorstämme zu erbringen, die keiner Wirtskonditionierung bedürfen. Da über ein Spektrum von in den Hamster transplantierbaren Tumoren menschlicher

Herkunft verfügbar ist, von denen sogar einzelne weitgestreute Metastasen in ihrem xenogenetischen Wirt zeigen, ist die Erforschung der die Wirksamkeit extremer Hypothermie am Überleben des heterotransplantierten menschlichen Krebses in vivo möglich. Ich berichte über vorläufige Ergebnisse, über den Erfolg der Kältetherapie bei zwei verschiedenen, in die Hamsterbackentasche xenotransplantierten Geschwülsten menschlicher Abstammung, GW-77 und GW-127.

TIERMODELL, VERSUCHSAPPARATUR UND METHODIK

In den Serienversuchen wurden zwei Tumorarten verwendet. Es handelt sich um transplantable Neoplasmen, die aus menschlichen Operationspräparaten abstammen und regelmäßig in den Taschenbacken nicht vorbehandelter syrischer Hamster (*Mesocricetus auratus*) fortgepflanzt wurden. GW-77, ein menschliches Colonicarcinom, ist ein gut differenzierter, Mucin produzierender Tumor, der noch organoide Strukturen und Siegelringzellen aufweist (10). Die zweite Tumorart, GW-127, unterscheidet sich auffallend durch sein stark undifferenziertes Aussehen, sein rascheres Wachstum, seine Invasivität und Metastasierung im Hamster (12). Er wurde aus einem menschlichen Ovarialcarcinom gewonnen und in fortgesetzter Reihe in unbehandelten Hamstern (ohne Wirtskonditionierung, wie Vorbestrahlung, Cortisongaben usw.) gezüchtet. Die Auswahl fiel auf Tumoren von so unterschiedlicher Herkunft, von histologischen und biologischen Qualitäten, um grundlegende Unterschiede



Abb. 12

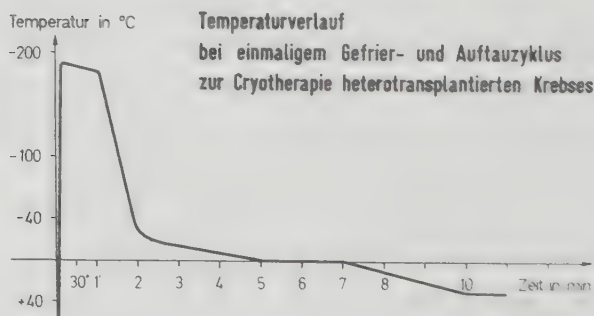


Abb. 13

in ihrem Verhalten gegen Cryotherapie herauszufinden.

Über Einzelheiten der von mir bei Prof. Sigel entwickelten Apparatur verweise ich auf die vorausgegangenen Kapitel (S.40 bis 51). Wie Bild 12 zeigt, strömt der flüssige Stickstoff unter Druck frei auf die Tumoroberfläche. Sonst wird durch dichtes Aufdrücken des Plexiglaszylinders und Absaugen das zu gefrierende Gewebeareal auf die gewünschte Fläche begrenzt; in diesem Fall wurde aber darauf verzichtet. Der über die Düse austretende flüssige Stickstoff vereiste die vollkommen dargestellte, den Tumor tragende Backentasche des Hamsters in Sekunden-schnelle, während das Tier durch einen Schild aus Karton abgeschirmt wurde. Die gesamte Backentasche wurde innerhalb von 10 sec auf -196°C gefroren (Abb. 13). Mit einer dünnen Thermonadel aus Kupfer-Konstantan und einem geeichten Meßgerät (THLS 1265, Fa. Hartmann und Braun, Frankfurt), wurde die im Tumor herrschende Temperatur registriert, die während der gewählten Gefrierdauer von einer Minute zu keiner Zeit -160°C überschritt. Aufgetaut wurde meistens unter natürlichen Bedingungen ohne künstliche Wärmezuführung. Es dauerte in der Regel zehn Minuten. Bei mehrmaligem Gefrieren beschleunigte ich die Auftauphasen mit Rotlicht auf etwa fünf Minuten.

Überlebende Tumorzellen wurden durch erneute Transplantation des nach Vereisung aufgetauten Gewebes in andere Hamsterbackentaschen, makroskopische Beobachtung der Volumenzunahme des Tumors und mikroskopische Beurteilung der Zellproliferation bestimmt. Zum Zwecke der Überpflanzung wurden die

aufgetauten Tumoren aus der Backentasche entfernt, mit einem Skalpell zu einem Brei zerkleinert, in einer Locke-Ringer-Glucose-Lösung unter Zusatz von Penicillin (100E/ml) und Streptomycin (0,6mg/ml) suspendiert und als großes Inoculum in die Backentaschen von je vier Hamstern (acht Backentaschen) gespritzt. Das histologisch nachweisbare Wachstum eines Tumors auch in nur einer Backentasche beweist, daß in der Gefrierläsion lebensfähige Tumorzellen vorhanden sind. Dieser direkte biologische Test soll genauer überlebende Zellen nachweisen, als es lediglich durch einfache Betrachtung struktureller Veränderungen möglich erscheint. Die als Versuchstiere für die Fremdüberpflanzung dienenden syrischen Hamster wogen zwischen 50 und 60 g und wurden bei Cryotherapie und Transplantation mit Evipan^R (100mg/kg i.p.,Firma Bayer) narkotisiert.

Jeder kältebehandelte Tumor wurde bis kurz vor Überpflanzung in situ, also in der Backentasche, belassen. Nach Cryotherapie wurde von jedem Tumor der größte Teil zur Transplantation verwendet und ein kleiner Teil zur nachträglichen histologischen Kontrolle seiner Malignität und zur Beobachtung etwaiger Zellveränderungen in Formalin fixiert.

TABELLARISCHE ÜBERSICHT ÜBER DIE OXYTHERMIE DES HIER TRANSPLANTIRTEN
MENSCHLICHEN KREBSSES

<u>Tumorart</u>	<u>Zahl der ver- eisten Tumoren</u>	<u>Gefrieren in 10 sec auf -190°C, über 1 min auf unter -160°C gehalten</u>	<u>Auftauen natürlich mit in ca. 10 min (ohne Kunst- hilfe)</u>	<u>Überpflanzung nach x-Stun- den in je 8 Hamster- baeckentaschen pro Tumor</u>	<u>Ergebnis Prozent- zahl ange- gangener Trans- plantate</u>
GW77	Kontrollkollektiv ohne jegliche Behandlung				100%
	5	1x	nur natürlich	1h	100%
	3	1x		2h	100%
	3	1x		3h	100%
					(aber verzöger- tes Wachstum)
	5	1x		4h	0%
	2	1x		24h	0%
	2	2x	kombiniert: zuerst	1h	0%
	8	2x	künstlich, dann	2h	0%
	2	2x	natürlich	4h	0%
	2	2x		24h	0%
GW127	Kontrollkollektiv ohne jegliche Behandlung				100%
	4	1x	nur natürlich	1h	100%
	12	1x		2h	100%
					(Vitalität stark geschwächt)
	12	1x		4h	0%
	2	1x		24h	0%
	4	2x	kombiniert: zuerst	1h	0%
	10	2x	künstlich, dann	2h	0%
	2	2x	natürlich	4h	0%
	4	2x		24h	0%
	2	3x	kombiniert: 2x	1h	0%
	2	3x	künstlich, 1x natürlich	24h	0%

ERGEBNISSE:

Die Tabelle umfaßt die Resultate für einmalige, zweimalige und dreimalige Gefrier- und Auftauzyklen. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde bei 1,2,3,4 und 24 Stunden nach dem letzten Auftauen ausgetestet. Während des Auftauens nahm die Tumormasse allmählich wieder ihre vorherige Farbe an und erschien später hyperämisch. Lebende Tumorzellen, nachgewiesen anhand der Transplantationsergebnisse, blieben nur bei einmaligem Gefrieren bis zu drei Stunden nach dem Auftauen erhalten. Keine intakten Tumorzellen oder eine hinreichende Zahl, die zu positiven Transplantaten führen, waren in den Neoplasmen vorhanden, die zweimal oder dreimal gefroren und aufgetaut wurden oder erst bei vier Stunden und später nach nur einmaligem Gefrieren überpflanzt wurden.

Histologisch erscheint das Aussehen der Zellpopulation des Tumors nach einmaligem Gefrieren und Auftauen vom Zeitpunkt der Transplantation abzuhängen, d.h. der Zelltod vollendet sich nach einmaligem Vereisen erst über eine zunehmende trübe Schwellung und feintropfige Entmischung.

Leider blieb mir keine Zeit, zahlreichere Untersuchungen über den Differenzierungsgrad ~~vom~~ Tumoren und dessen Beziehung zum Zeitpunkt des Zelltodes nach einmaligem Gefrieren und Auftauen vorzunehmen. Die sehr unterschiedlichen GW-77 und GW-127-Tumoren ergaben in den Versuchen übereinstimmende Absterbezeiten von ungefähr vier Stunden nach Auftauen. Bei zweimaligen Gefrier- und Auftauzyklen schließt sich keine Periode zunehmender Zellregression an, sondern die Absterbezeit nach dem Auftauen erübrigt sich und der cryonekrotische Effekt ist immer hundertprozentig.

DISKUSSION UND AUSWERTUNG:

In dem vorausgegangenen Beitrag über die theoretischen Grundlagen der Kältechirurgie wies ich auf die Möglichkeit hin, daß Tumorzellen Temperaturen bis unter -200°C infolge eines Zweistufeneffektes überleben können. Bereits in älteren Veröffentlichungen von Paul Ehrlich (43), Michaelis (42) und Hans Auler (44) wurde gezeigt, daß Tiertumoren, wie das Jensen-Sarkom oder der Rous-Tumor u.a., nach Aufbewahren in flüssiger Luft erneut transplantiert werden konnten, obgleich sie in ihrer Vitalität stark geschädigt waren. Ich hegte deshalb Bedenken, ob bei raschem Gefrieren von Geschwülsten neben zelltötender homogener Nucleation in vielleicht geringem Maße Zellen durch ungleichmäßige Wärmeleitung gefriertrocknen und überleben können. Bezeichnend für den Zweistufeneffekt ist eine Phase des "Anfrostens" mit spationiertem Wasserentzug, so daß sich intrazellulär keine schädigenden Eiskristalle bilden können(45,46). Brian E. Heard bestimmte diesen "paramorphen" Zellzustand mit der Methode der Kältealkoholfixation oder Gefriertrocknung im Hochvakuum(30).

In diesen Versuchen bestimmte ich unabhängig von Arbeits-hypothesen rein empirisch die zelltötende Wirkung raschen Gefrierens und langsamen Auftauens. Verschiedene Folgerungen und Widersprüche ergaben sich aus diesen Untersuchungen:

- 1) Zweimaliges oder mehrfaches Gefrieren und Auftauen zerstört die Tumorzellen und verhindert jegliche weitere Proliferation in situ oder nach Transplantation.
- 2) Es scheint, daß ebenfalls einmaliges Gefrieren und Auftauen für Krebszellen tödlich sein kann, jedoch in einem eher graduellen und progressiven Prozeß.

Sobald nämlich die noch lebensfähigen Zellen aus der Tumormasse in 1h oder 2h nach Gefrieren und Auftauen entfernt und überpflanzt wurden, nahmen sie wiederum ihre Vitalität und ihr proliferatives Wachstum auf. In weiteren Versuchsserien ermittelte ich die Zeit, in der nach einmaligem Gefrieren Krebszellen durch den cryonekrotischen Effekt vollends absterben. 3h nach Auftauen erhielt man noch positive Transplantationsergebnisse, wobei allerdings das Wachstum verzögert und damit die Vitalität der Tumoren herabgesetzt war. Nach 4h und später ließen sich im Transplantationsversuch keine lebensfähigen Tumorzellen nachweisen. Krebszellen sterben nach einmaliger Vereisung offensichtlich erst nach eingetretener Ischämie durch Gefäßthrombosierung (25; s.S. 70) in situ ab. Vermutlich vermögen die lokalen Stoffwechselstörungen, die durch einmaliges Gefrieren an den Membransystemen vorgeschädigten Zellen vollends zu zerstören.

Da Dr. Goldenberg herausfand, daß allein ungefähr 10 GW-127-Tumorzellen erfolgreich transplantiert werden können (41), legen diese Versuche den Schluß nahe, daß letztlich bei 4h und später nach einmaliger Cryotherapie oder bereits bei 1h und mehr nach zwei- und mehrfachem Gefrieren und Auftauen weniger als 10 oder keinerlei lebensfähige Zellen in dem auf unsere Weise gefrorenen GW-127-Tumoren vorhanden waren.

Weil lebensfähige Tumorzellen, wenn auch nur für kurze Zeit, nach einmaligem extremen Gefrieren nachgewiesen werden können, scheint sich der erst nach 4h auftretende Zelltod innerhalb einer Gefrierläsion nicht primär auf latente, zellschädigende Veränderungen, wie Membranschädigung und Denaturieren von Eiweißkörpern (s.S. 31) zurückzuführen, sondern auf Veränderungen innerhalb und in der Umgebung des vereisten Tumors. Faktoren, wie die Bildung von toxischen Stoffwechselprodukten bei unzureichender Ernährung und Vascularisation infolge Gefäßstase und Thrombosierung und die Unfähigkeit noch lebensfähiger Zellen, zur Peripherie des Reaktionszentrums zu wandern, sind wahrscheinlich wichtige Ursachen für das nach 4h letztlich eintretende Absterben der zuvor noch lebensfähigen Krebszellen.

Beließ man die einmalig vereisten Tumoren länger als einen Tag in situ und sah von jeglicher Transplantation ab, um die Tumoren in den Hamsterbackentaschen weiterwachsen zu lassen, so stellten sich derart ausgedehnte Nekrosen ein, daß die Versuchstiere an Infekten und der Unmöglichkeit

zur Nahrungsaufnahme eingingen. Auch bei einmaligem, raschen Gefrieren und langsamem Auftauen sterben Zellen größtenteils ab, wenn auch so viele überleben, daß die Transplantate positiv werden. Bemerkenswert erscheint mir ebenfalls die Vitalitätseinbuße der GW-77- und GW-127-Tumoren bei 3 bzw. 2h nach einmaligem Gefrieren und Auftauen. Normalerweise vergehen bei GW-77-Tumoren 3 Wochen und bei GW-127-Tumoren ca. 10 Tage, bis sie im Hamster zu einer Größe heranwachsen, bei der sie erneut transplantiert werden müssen. In diesem Fall jedoch benötigte das Wachstum einer Tumorgeneration die doppelte bis dreifache Zeit. Ob die eingeschränkte Vitalität, die sich am verzögerten Wachstum zeigte, nur auf indirekte Zellschädigung, wie Gefäßthrombosierung, Ischämie usw., zurückzuführen ist oder auch auf eine Vorschädigung an Zellmembranen, kann ich zur Zeit nicht beantworten.

Bei Excision eines einmalig cryotherapierten Tumors innerhalb der 4h-Grenze besteht die Gefahr der Verschleppung noch vitaler Zellen und deren Angehen im Wundbereich, ganz abgesehen von dem Risiko inadäquat eingefroren und aufgetaut zu haben. Für eine weitgehend kurativ konzipierte Cryotherapie des Krebses empfehle ich deshalb auf Grund der Versuche zweimalige oder mehrfache Gefrier- und Auftauzyklen. Die Tumoren sollen nach Möglichkeit "en bloc" rasch gefroren werden, um einen Zweistufeneffekt zu verhindern. und langsam auftauen.

ZUSAMMENFASSUNG:

Ich untersuchte das Überleben und Absterben menschlicher Krebszellen bei 1,2,3,4 und 24h nach ein-, zwei- und dreimaligem Gefrieren und Auftauen. Durch Gefrierversuche an zwei xenotransplantierten Tumorarten menschlichen Ursprungs (GW-77 und GW-127) in den Taschenbacken unbehandelter syrischer Hamster mit flüssigem Stickstoff fand ich heraus, daß Replantation der kältetherapierten Tumoren bei einmaligem Gefrieren und Auftauen innerhalb von 3h zu erneutem Tumorwachstum führen, nach 4h und später keine positiven Transplantate liefern. Einmaliges rasches Gefrieren und Auftauen führen wohl zum nekrotischen Zerfall eines Tumors, jedoch die Möglichkeit zum erneuten infiltrativen Wachstum besteht, da genügend Krebszellen bis über 3h in situ überleben und erst nach 4h vollends absterben. Ich vermute, daß der endgültige Zelluntergang auf die bewiesene Kältethrombosierung (s.S.) mit folgender Ischämie und Stoffwechselstörungen in der aufgetauten Tumorregion zurückgeführt werden kann. Zweimaliges oder mehrfaches rasches Gefrieren und langsames Auftauen kann als kurative Krebstherapie gelten, da selbst nach 1h oder später keine lebenden Tumorzellen im Transplantationsversuch nachzuweisen waren. Zudem sinkt mit mehrmaligen Gefrier- und Auftauzyklen das Risiko, Tumoren inadäquat vereist zu haben.

Diese Versuche wurden bei wertvoller Anregung und unter ständiger Kontrolle meines Doktorvaters, Herrn Prof. Dr. A. Sigel durchgeführt.

Besten Dank möchte ich an dieser Stelle der MTA, Fräulein V. Ward, für ihre Mitarbeit aussprechen. Sie führte nach den Gefrierversuchen die Transplantationen aus und kontrollierte die Tiere in Bezug auf Tumorwachstum.

Zu danken habe ich ebenfalls Herrn Dr. Goldenberg für das Überlassen der Versuchstiere, Beratung über die Zuverlässigkeit der Transplantationsmethoden und Beurteilung des histologischen Ergebnisses.

LITERATURVERZEICHNIS:

1. Karow, A.M.jr. und Webb: Surg. Gyn. Obstet. 119,
609-620, 1964
2. Fay, T. und Henny, G.C.: Surg. Gyn. Obstet. 66, 512, 1938
3. Smith, L.W.: Archives Pathology 30, 424-439, 1940
4. Smith, L.W. und Fay, T.: J.A.M.A. 113, 653, 1939
5. McCravey, A.: New York State J. of Med. 40, 1435-1440, 1940
6. Jones, A.J., Graham, J. und Mueller, A.: American J.
of Surg. 52, 14-23, 1941
7. Newman, M.K. und Berris, J.M.: Archives Physical
Medicine and Rehabilit. 22, 161-170, 1941
8. Moran, T.: Proc. Roy. Soc. B105, 177-197, 1929
9. Smith, Polge, Smiles: angeführt in (10), Kapitel:
Direkte mikroskop. Beobachtung lebender Zellen, S.409
10. Smith, A.U.: Biological Effects of Freezing and Super-
cooling, Baltimore, The Williams and Wilkins 1961,
Monographie
11. Lovelock, J.E.: Proc. Roy. Soc. Med. 47, 60, 1954
12. Craigie, J.: Advances in Cancer Research 2, 197-228, 1954
13. Howard, E.: American J. Cancer 23, 87-93, 1935
14. Wangenstein, O.H.: J.A.M.A. 180, 439, 1962
15. Rudolph, J.R. und Schenk, E.A.: Morphologic Changes
Associated with Bladder Freezing, Annual Meeting
of Am. Urol.' Associat., New Orleans, May 1965
16. Gibbons, R.P.: J. of Urol. 95, 33, 1966
17. Meryman, H.T.: Physiolog. Reviews 37, 233-251, 1957
18. Meryman, H.T.: The Mechanisms of Freezing in Biological
Systems (local edited), angeführt in (1), S.616

19. Rey, L.R.: Techn. Hosp. (Paris) 141,33,1959
20. Mazur, P.: J. Bact. 82,662,1961
21. Luyet, B.J. und Keane, J.jr.: Biodynamica 7,281,1955
22. Trump, B.F., Goldblatt, P.J. und Griffin, C.C.:
Lab. Invest. 13,967,1964
23. Schallock, G. und Lindner, J.: Deutsches med. J.
17,514,1966
24. Van den Berg und Rose: angeführt in (10).S.441-443
25. Maskowitz und Calvin: angeführt in (10),Kapitel:
Beweise der physiol. Chemie,S.418-440
26. McDonald, J.H., Taylor, C.B. und Heckel, N.J.:
J. Urol. 64,326,1950
27. Baker, O.G.: Nord. Med. 26,743,1966
28. Gage a. al.: Cryobiology 2,14,1955
29. Allen, F.M. und Lange: angeführt in (26),S.327
30. Heard, B.E.: Brit. J. of Surg. 42,659,1955
31. Gonder, M.J., Soanes, W.A. und Smith, V.: Invest.
Urol. 1,610,1964
32. McDonald, D.F., Mobley, Th.L. und Rudolph, J.H.:
J. of Urol. 95,526-530,1966
33. Cooper, I.S.: Cryogenic Surgery, A new method of
destruction or extirpation of benign or malignant
tissues, New Engl. J. Med. 268,743-749,1963

34. Gahan, W.G.: Cryosurgery of malignant and benign tumors,
Fed. Proc. 24,5237-5240,1965
35. Kaplan, J.H. und Kaplan, L.: Cryogenic, electro-
coagulative and spontaneous necrosis of a bladder
neoplasm, A preliminary study, J. Urol. 95,531-535,
1966
36. Blackwood, J., Moore, F.T. und Pace, W.G.: Cryotherapy
for malignant tumors, Cryobiology 4,33-38,1967
37. McDonald, D.F., Mobley, T.L. und Rudolph, J.H.:
Cryotherapy of a heterografted human bladder tumor,
J. Urol. 95,526-530,1966
38. Goldenberg, D.M.: Die Verwendung einiger neuer Human-
Tumorstämme in der experimentellen Krebsforschung,
1. und 2. Teil, Arch. Geschwulstforsch. 29,1-17,
18-35,1967
39. Goldenberg, D.M.: The human tumor - hamster host
testing model, A reappraisal, Abstract No. 12,
4th Annual Meeting, Amer. Soc. Clin. Oncology,
Atlantic City, N.J.,1968
40. Goldenberg, D.M., Müller, E. und Witte, S.: In vivo
proliferation of heterotransplanted human cancer
cells, Europ. J. Cancer 3,315-319,1967
41. Goldenberg, D.M.: Manuscript in preparation

43. Michaelis, L.: Med. Klin. 1, 203-209, 1905, Cit. by Craigie (12)
45. Ehrlich, P.: Zeitschrift für Krebsforschung 1, 50-52, 1907
44. Anker, W.: Zeitschrift für Krebsforschung 35, 103-108, 1915
46. Klink, J.: Überleben von bösartigen und normalen Geweben nach Einfrieren bis zu -253°C , Klin. Wschr. 13, 450-452, 1917
47. Shohet, S.R.: Cryobiology 1, 47-61, 1957

Lebenslauf

Ich wurde am 17.1.1942 als Sohn des Müllers Anton Schrott und dessen Ehefrau Rosina in Gschwandt, Oberpfalz geboren.

Mit sechs Jahren besuchte ich die Volksschule in Gleißenberg.

Im September 1953 trat ich in die Oberrealschule in Cham ein und legte nach neun Jahren am 18. Juli 1962 die Reifeprüfung ab.

Im Winterhalbjahr 1962/63 begann ich mein Medizinstudium an der Universität Erlangen-Nürnberg. Nach zwei Semestern legte ich am 1. November 1963 das Vorphysikum und nach fünf Semestern am 11. Mai 1965 das Physikum ab. Nach dem ersten klinischen Semester wechselte ich im Oktober 1965 für ein Semester an die Universität Wien. Im Mai 1966 setzte ich das klinische Studium an der Universität Erlangen fort und legte nach insgesamt elf Semestern am 2.8.1968 das medizinische Staatsexamen ab.

Am 15. September 1968 begann ich bei Prof.Dr. Sigel meine weitere Ausbildung als Medizinalassistent in der Urolog. Abt. der Chirurgischen Universitätsklinik Erlangen.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hegl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
